



**HAL**  
open science

# **Rôle de la voie Notch dans l'inflammation liée à IL-17A et médiée par les cellules souches du tissu adipeux chez le sujet obèse**

Julien Pestel

## **► To cite this version:**

Julien Pestel. Rôle de la voie Notch dans l'inflammation liée à IL-17A et médiée par les cellules souches du tissu adipeux chez le sujet obèse. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2021. Français. ⟨NNT : 2021LYSE1317⟩. ⟨tel-04343692⟩

**HAL Id: tel-04343692**

**<https://theses.hal.science/tel-04343692v1>**

Submitted on 14 Dec 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1317

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale ED 205**

**(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé)**

**Spécialité de doctorat :**

**Discipline :** Biologie cellulaire

Soutenue publiquement le 13 décembre 2021, par :

**Julien Pestel**

---

# **Rôle de la voie Notch dans l'inflammation liée à IL-17A et médiée par les cellules souches du tissu adipeux chez le sujet obèse**

---

Devant le jury composé de :

BOULOUMIE-DIEHL, Anne

GIORGETTI-PERALDI, Sophie

MEURETTE, Olivier

NATAF, Serge

VENTECLEF, Nicolas

DR INSERM (UMR 1297)

CR INSERM (U1065)

MCF INSERM (UMR 1052/CNRS 5286)

PU-PH INSERM (U1028)

DR INSERM (UMR 1138)

Rapporteuse

Rapporteuse

Examineur

Président du jury

Examineur

EL JAAFARI, Assia

PH/INSERM (U1060) /INRA (U1397)

Directrice de thèse



# Remerciements

En premier lieu je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, le Docteur Assia El Jaafari pour m'avoir soutenu durant ces trois années de thèse mais également pour la confiance que vous m'avez accordée en me confiant ce sujet. Je vous remercie pour tous vos encouragements, précieux conseils et brillantes idées qui ont fait avancer ce projet de thèse. Merci également de m'avoir fait participer à plusieurs projets de recherche en parallèle de celui-ci, me permettant d'élargir mes connaissances sur beaucoup de sujets.

Je souhaite également remercier le Docteur Hubert Vidal, qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire ainsi que dans son équipe afin de réaliser ma thèse. Je vous remercie pour vos conseils et m'avoir permis de terminer ce travail de thèse dans les meilleures conditions.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse, le Docteur Anne Bouloumié-Diehl, le Docteur Sophie Giorgetti-Peraldi, le Docteur Olivier Meurette, le Professeur Serge Nataf et le Docteur Nicolas Venterclef qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse.

# **Table des matières**

## Table des matières

<i>Liste des publications et congrès</i>	9
<i>Liste des abréviations</i>	13
<i>Résumé</i>	19
<i>Introduction</i>	23
<i>I. Obésité et pathologies associées</i>	25
A. Définition et quelques chiffres	25
B. Causes de l'obésité	27
C. Pathologies associées à l'obésité	31
<i>II. Le tissu adipeux blanc sain et pathologique</i>	37
A. Localisation et composition du tissu adipeux blanc	37
B. Fonctions du tissu adipeux blanc	41
C. L'expansion du tissu adipeux	43
D. L'hétérogénéité des progéniteurs adipocytaires	47
E. La fonction sécrétoire du tissu adipeux blanc	49
<i>III. Inflammation et infiltration du tissu adipeux blanc au cours de l'obésité</i>	57
A. Les cellules de l'immunité impliquées dans l'inflammation du tissu adipeux	57
B. L'initiation de l'inflammation du tissu adipeux précède la résistance à l'insuline	68
C. Les voies de l'inflammation	73
D. La mise en place de la résistance à l'insuline au sein du tissu adipeux	77
<i>IV. Les lymphocytes Th17</i>	79
A. Définition et caractéristiques	79
B. Rôle durant l'immunité	82
C. Les Th17 au cours de l'obésité	84
<i>V. Propriétés des cellules souches du tissu adipeux : issues de sujets minces ou obèses</i>	86

A. Généralités sur les cellules souches _____	86
B. Les CSA provenant du tissu adipeux des sujets minces : caractéristiques et capacités d'immunomodulation _____	87
C. Les CSA au cours de l'obésité _____	94
<b>VI. Objectifs _____</b>	<b>100</b>
<i>Description du modèle de coculture _____</i>	<i>101</i>
<i>Résultats _____</i>	<i>105</i>
<i>IL-17A contributes to propagation of inflammation but does not impair adipogenesis and/or insulin response, in adipose tissue of obese individuals. _____</i>	<i>107</i>
A. Résumé de l'article : _____	108
<i>Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit IL-17A Secretion through decreased ICAM-1 Expression in T Cells Co-Cultured with Adipose-Derived Stem Cells harvested from Adipose Tissues of Obese Subjects. _____</i>	<i>123</i>
A. Contexte scientifique de l'étude _____	124
B. Résumé de l'article : _____	133
<i>Involvement of glycated albumin in adipose-derived-stem cell-mediated interleukin 17 secreting T helper cell activation. _____</i>	<i>147</i>
A. Contexte scientifique de l'étude _____	149
B. Résumé de l'article _____	150
<i>Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediate PD-L1 Overexpression in the White Adipose Tissue of Obese Individuals, Resulting in T Cell Dysfunction. _____</i>	<i>167</i>
A. Contexte scientifique de l'étude _____	168
B. Résumé de l'article _____	173
<i>Involvement of the Notch pathway and its ligand DNER in obesity-mediated inflammation of adipose tissues. _____</i>	<i>191</i>
A. Contexte scientifique de l'étude _____	193
B. Article _____	208

<b><i>Discussion et perspectives</i></b>	<b>225</b>
<b><i>I- Perspectives à court-terme</i></b>	<b>231</b>
<b><i>II-Perspectives à long terme</i></b>	<b>232</b>
<b><i>Bibliographie</i></b>	<b>239</b>

# **Liste des publications et congrès**

## Publications

- Involvement of the Notch pathway and its ligand DNER in obesity-mediated inflammation of adipose tissues.

*Julien Pestel..... Assia Eljaafari.*

En préparation

- Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediate PD-L1 Overexpression in the White Adipose Tissue of Obese Individuals, Resulting in T Cell Dysfunction.

*Assia Eljaafari, Julien Pestel, Brigitte Le Magueresse-Battistoni, Stephanie Chanon, Julia Watson, Maud Robert, Emmanuel Disse, Hubert Vidal.*

Cells, 2021.

- Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit IL-17A Secretion through decreased ICAM-1 Expression in T Cells Co-Cultured with Adipose-Derived Stem Cells harvested from Adipose Tissues of Obese Subjects.

*Marwa Chehimi, Robert Ward, Julien Pestel, Maud Robert, Sandra Pesenti, Nadia Bendridi, Marie-Caroline Michalski, Martine Laville, Hubert Vidal, Assia Eljaafari.*

Molecular nutrition and food research, 2019.

- IL-17A contributes to propagation of inflammation but does not impair adipogenesis and/or insulin response, in adipose tissue of obese individuals.

*Julien Pestel, Marwa Chehimi, Mélanie Bonhomme, Maud Robert, Hubert Vidal, Assia Eljaafari.*

Cytokine, 2020.

- Involvement of glycated albumin in adipose-derived-stem cell-mediated interleukin 17 secreting T helper cell activation.

*Julien Pestel, Maud Robert, Sara Corbin, Hubert Vidal, Assia Eljaafari.*

World Journal of Stem Cells,2020

- Tissus adipeux : leur activité sécrétoire et leur rôle dans les maladies métaboliques associées à l'obésité.

*Julien Pestel, Assia Eljaafari.*

Traité de Nutrition Clinique de la Société Francophone de Nutrition clinique et métabolisme, (Soumis).

## Participation aux congrès

- **Journée scientifique de l'EDISS**, Octobre 2019.

Présentation affichée : « L'IL-17A contribue à la propagation de l'inflammation mais n'altère pas l'adipogenèse et/ou la réponse à l'insuline du tissu adipeux chez les individus obèses. »

- **Journée scientifique de la SFR Lyon Est**, Novembre 2019.

Présentation affichée : « IL-17A contributes to propagation of inflammation but does not impair adipogenesis and/or insulin response, in adipose tissue of obese individuals. »

- **Société Francophone du Diabète**, Septembre 2020.

Présentation affichée : « Implication de la voie Notch et de son ligand DNER dans la promotion des lymphocytes Th17 médiée par les cellules souches adipocytaires, au sein du tissu adipeux obèse. »

- **European Association for the study of Diabetes**, Septembre 2020.

Présentation orale : « Involvement of the Notch pathway and its ligand DNER in obesity-mediated inflammation of adipose tissue. »

## Activités complémentaires

- **Formation concepteur en recherche animale niveau I : modèles murins et génétiquement modifiés**, Juin 2019.

- **Activité complémentaire d'enseignement** (Physiologie animale et Culture numérique), durant la 1<sup>er</sup>, 2<sup>eme</sup> et 3<sup>eme</sup> année de thèse

- **Membre du comité d'organisation** de la Journée de l'EDISS, de 2019 à 2021.



# **Liste des abréviations**

---

**A**

ACC1 .....	<i>Acétylcoenzyme A carboxylase 1</i>
ADAM .....	<i>A-Disintegrin-And-Metalloprotéase</i>
AG.....	<i>Acides gras</i>
AGEs.....	<i>Advanced glycation end-product</i>
AGNE .....	<i>Acide gras libre non estérifiés</i>
AGPI.....	<i>Acides gras polyinsaturés</i>
ALA .....	<i>Acide <math>\alpha</math>-linoléique</i>

---

**B**

BPCO.....	<i>Bronchopneumopathie chronique obstructive</i>
-----------	--

---

**C**

CFU-F .....	<i>Colony-forming unit fibroblasts</i>
CMH .....	<i>Complexe majeur d'histocompatibilité</i>
CMN .....	<i>Cellules mononuclées du sang</i>
CoA.....	<i>Coenzyme A</i>
COX-2.....	<i>Cyclooxygénase 2</i>
CPA.....	<i>Cellules présentatrices d'antigène</i>
CSA.....	<i>Cellules souches adipocytaires</i>
CSAob.....	<i>CSA d'individus en état d'obésité</i>
CTL.....	<i>Lymphocytes T cytotoxiques</i>
CTLA-4.....	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>

---

**D**

DC.....	<i>Cellules dendritiques</i>
Dik1 .....	<i>Delta like non-canonical Notch ligand 1</i>
DOHAD .....	<i>Developmental Origin of Health and Diseases</i>
DOS .....	<i>Delta and OSM-11-like proteins</i>
DSL.....	<i>Delta, Serrate et Lag2</i>
DT2 .....	<i>Diabète de type II</i>

---

**F**

FATP.....	<i>Fatty acid transport protein</i>
-----------	-------------------------------------

FFA4 .....	<i>Rrécepteur 4 des acides gras libres</i>
FGF2 .....	<i>Fibroblast growth factor</i>
FLT3L.....	<i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i>
FoxP3 .....	<i>Forkhead box P3</i>

---

## **G**

GATA3 .....	<i>GATA binding protein 3</i>
GLUT4.....	<i>Transporteur de glucose 4</i>
GM-CSF.....	<i>Facteur de stimulation des colonies de granulocytes</i>
GSI.....	<i>Inhibiteur de la <math>\gamma</math>-sécrétase</i>

---

## **H**

HES .....	<i>Hairy and enhancer of split</i>
HGF .....	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF-1 $\alpha$ .....	<i>Hypoxia-inductible factor-1<math>\alpha</math></i>
HMGB1.....	<i>High mobility group box 1 protein</i>
HSC.....	<i>Cellules souches hématopoïétiques</i>

---

## **I**

ICAM-1.....	<i>InterCellular Adhesion Molecule-1</i>
IDO .....	<i>Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase</i>
IL-1 $\beta$ .....	<i>Interleukine-1<math>\beta</math></i>
IL-6 .....	<i>Interleukine-6</i>
ILC2 .....	<i>Lymphocytes innées de type 2</i>
IMC.....	<i>Indice de masse corporelle</i>
IRAK1.....	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRS-1 .....	<i>Insuline receptor substrate 1</i>

---

## **J**

JNK .....	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
-----------	---------------------------------

---

## **L**

LA .....	<i>Acide linoléique</i>
LPL .....	<i>Lipoprotéine lipase</i>

LPS.....*Lipopolysaccharide*

---

## **M**

MAML.....*Mastermind-like protein*

MAPK.....*Mitogen-activated protein kinase*

MC4R.....*Récepteur 4 à la mélanocortine*

MCP-1.....*Monocyte chemoattractant protein-1*

MIP-2.....*Protéine inflammatoire des macrophages-2*

---

## **N**

NADPH.....*Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*

NECD.....*Notch extracellular domain*

NF- $\kappa$ B.....*Nuclear factor-kappa B*

NICD.....*Notch intracellular domain*

NLRP-3.....*Nod-like receptor protein 3*

NRR.....*Negative regulatory region*

---

## **O**

OMS.....*Organisation mondiale de la santé*

---

## **P**

PCB.....*Polychlorobiphényle*

PD-1.....*Programmed cell death protein 1*

PDGF.....*Facteur de croissance dérivé des plaquettes*

PD-L1.....*Programmed death-ligand 1*

PGE2.....*Prostaglandine E2*

PHA.....*Phytohémagglutinine*

PI3K.....*Phosphoinositide 3-kinase*

PIP3.....*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*

POMC.....*Pro-opiomélanocortine*

PP2A.....*Protéine phosphatase 2*

pré-CTL.....*Lymphocytes T pré-cytotoxiques*

---

**R**

RAGE.....	<i>Receptor of advanced glycated end products</i>
RAM .....	<i>RBP-Jk-associated molecule</i>
REDD1.....	<i>Regulated in development and DNA damage response-1</i>
RORC.....	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
ROS.....	<i>Espèces réactives de l'oxygène</i>

---

**S**

STAT4.....	<i>Signal transducer and activator of transcription 4</i>
STAT6.....	<i>Signal transducer and activator of transcription 6</i>
SVF .....	<i>Fraction vasculaire stromale</i>

---

**T**

TAK1 .....	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TAsc.....	<i>Tissu adipeux blanc sous cutané</i>
TAvis.....	<i>Tissu adipeux viscéral</i>
TBX21.....	<i>T-box transcription factor 21</i>
TG .....	<i>Triglycérides</i>
Th1 .....	<i>Lymphocyte T helper 1</i>
Th17.....	<i>Lymphocyte T helper 17</i>
Th2.....	<i>Lymphocyte T-helper 2</i>
TLR4.....	<i>Toll Like Receptor 4</i>
TNF- $\alpha$ .....	<i>Tumor necrosis factor-a</i>
TRAF6 .....	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
Treg.....	<i>Lymphocyte T régulateur</i>

---

**V**

Vaspine .....	<i>Visceral adipose tissue-derived serpin</i>
VCAM-1 .....	<i>Vascular cell adhesion protein-1</i>
VEGF .....	<i>Vascular endothelial growth factor</i>



# Résumé

## **Implication de la voie Notch et de son ligand DNER dans l'inflammation liée aux lymphocytes Th17 et médiée par les cellules souches adipocytaires, au sein du tissu adipeux du sujet obèse**

Au cours de l'obésité, le tissu adipeux (TA) est progressivement infiltré par des cellules immunitaires inflammatoires dont les lymphocytes Th17, et dont l'activation est médiée par les cellules souches adipocytaires d'origine mésenchymateuse du sujet obèse (CSAob) ainsi que par les adipocytes. Ceci initie une insulino-résistance au sein du TA, et contribue aux mécanismes induisant le diabète de type 2 (DT2). La voie de signalisation Notch est connue pour réguler le phénotype des lymphocytes T, et DNER, un ligand non-canonique de cette voie, est lui-même connu pour inhiber l'adipogenèse, et dont le gène codant est un gène impliqué dans la susceptibilité au diabète de type 2. Ces données nous ont conduit à évaluer l'implication de DNER et de Notch dans le modèle d'inflammation médié par les CSAob.

A l'aide d'un modèle humain de co-culture entre des CSAob et des cellules immunes conduisant à la production d'IL-17A, l'implication de la voie Notch a été évaluée en utilisant un inhibiteur de la gamma sécrétase nécessaire à l'activation de cette voie. J'ai pu montrer son rôle dans l'activation des lymphocytes Th17. Comme DNER est impliqué dans l'inhibition de l'adipogenèse, et dans la susceptibilité au diabète de type 2, j'ai par la suite analysé son éventuelle implication dans ce modèle, à l'aide d'ARN interférent de DNER (siDNER). Les résultats *in vitro* ont confirmé cette hypothèse. Par la suite, j'ai évalué l'effet de la délétion de DNER *in vivo* dans des souris rendues génétiquement déficientes pour le gène DNER. Celles-ci ont été nourries avec un régime hypercalorique ou normocalorique pendant 16 semaines et deux groupes de souris sauvages soumises aux mêmes régimes ont été utilisés comme contrôles. Une augmentation de l'expression du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'IFN $\gamma$  dans les TA viscéral et sous-cutané a permis de démontrer l'inflammation du TA dans le groupe des souris sauvages surnourries. De façon intéressante, le KO de DNER a inhibé l'expression de TNF- $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$  dans le TA sous-cutané et de l'IFN $\gamma$  dans le TA viscéral, en comparaison aux souris sauvages. De plus, une amélioration de l'homéostasie glucidique et lipidique ainsi qu'une diminution de la stéatose hépatique et une diminution du poids des souris et de leur TA ont été observées.

Nos résultats démontrent donc le rôle de Notch et de son ligand DNER dans l'inflammation du TA des sujets obèses, et dans le syndrome métabolique. Ceci suggère de nouvelles pistes pour le traitement de l'inflammation chronique associée à l'obésité et ses conséquences métaboliques.

**Mots clés : obésité, inflammation du tissu adipeux, cellules souches adipocytaires, Th17, Notch, DNER**

### **Involvement of the Notch pathway in inflammation linked to IL-17A and mediated by adipose derived-stem-cell from obese subjects**

During obesity, adipose tissue (AT) is progressively infiltrated by immune cells including inflammatory Th17 lymphocytes secreting IL-17A, which activation is mediated by adipose-derived mesenchymal stem cells (obASCs) and as adipocytes. This contributes to the initiation of insulin resistance in adipose tissue, and subsequent type 2 diabetes. The Notch pathway is known to regulate helper T cell differentiation. DNER is a non-canonical NOTCH ligand, known to inhibit adipogenesis, and to be encoded a susceptibility gene for type 2 diabetes. Therefore, these data led us to investigate the involvement of NOTCH and DNER in obASCs-mediated inflammation.

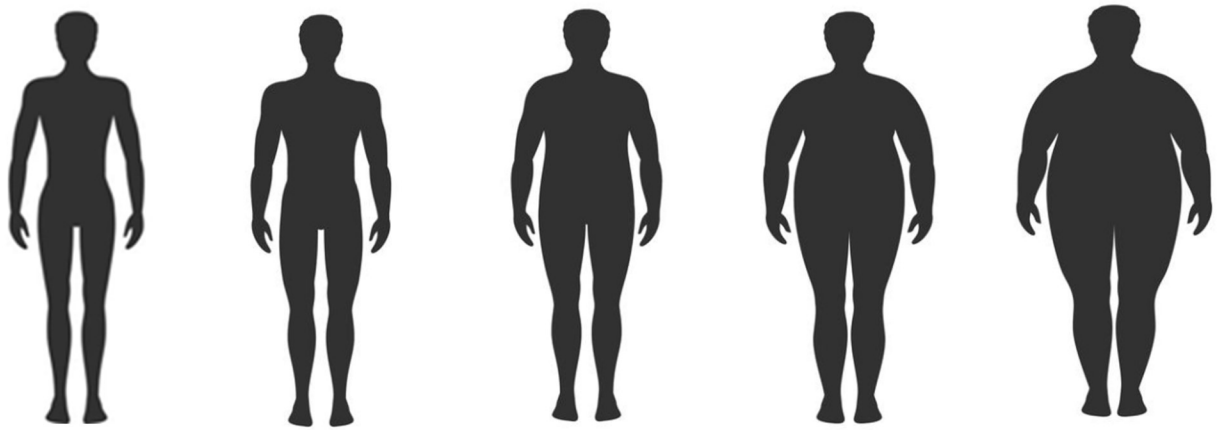
We demonstrated the involvement of the Notch pathway in a human co-culture model using obASCs and immune cells and known to result in IL-17A secretion following activation with mitogen. Using the Notch inhibitor, DAPT which inhibits gamma-secretase, I was able to show the role of Notch in IL-17A secretion. I analyze DNER putative involvement in this *in vitro* model. I used DNER interfering RNA (siDNER). Results confirmed this hypothesis by showing a decrease of IL-17A secretion in the presence of siDNER. Further, I have also evaluated the effects on AT inflammation of DNER deletion *in vivo* using DNER-deficient mouse model. Wild type (WT) or DNER KO mice were fed with a hypercaloric or normocaloric diet for 16 weeks. Adipose tissue inflammation was confirmed through increased expression of TNF $\alpha$ , IL-6 and IFN $\gamma$  in visceral and subcutaneous adipose tissue. Interestingly, DNER-KO mice showed decreased expression of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  in subcutaneous AT and IFN $\gamma$  in visceral

AT, compared to wild-type mice. In addition, an improvement in glucose and lipid homeostasis and a decrease in mouse weight and AT weight were observed. Moreover, hepatic steatosis also decreased.

Our results therefore show the implication of Notch and its ligand DNER in AT inflammation during obesity, and in the subsequent metabolic alterations. This suggests new approaches for the treatment of obesity-associated chronic inflammation and its metabolic consequences.

**Keywords : obesity, adipose tissue inflammation, adipose-derived stem cells, Th17, Notch, DNER**

# **Introduction**



Normal	Surpoids	Obésité Modérée	Obésité Sévère	Obésité Morbide
18,5 à 24,9	25 à 29,9	30 à 34,9	35 à 39,9	> 40
<b>Indice de Masse corporelle</b>				

**Figure 1 : Les différents seuils d'indice de masse corporelle (IMC)**

# I. Obésité et pathologies associées

## A. Définition et quelques chiffres

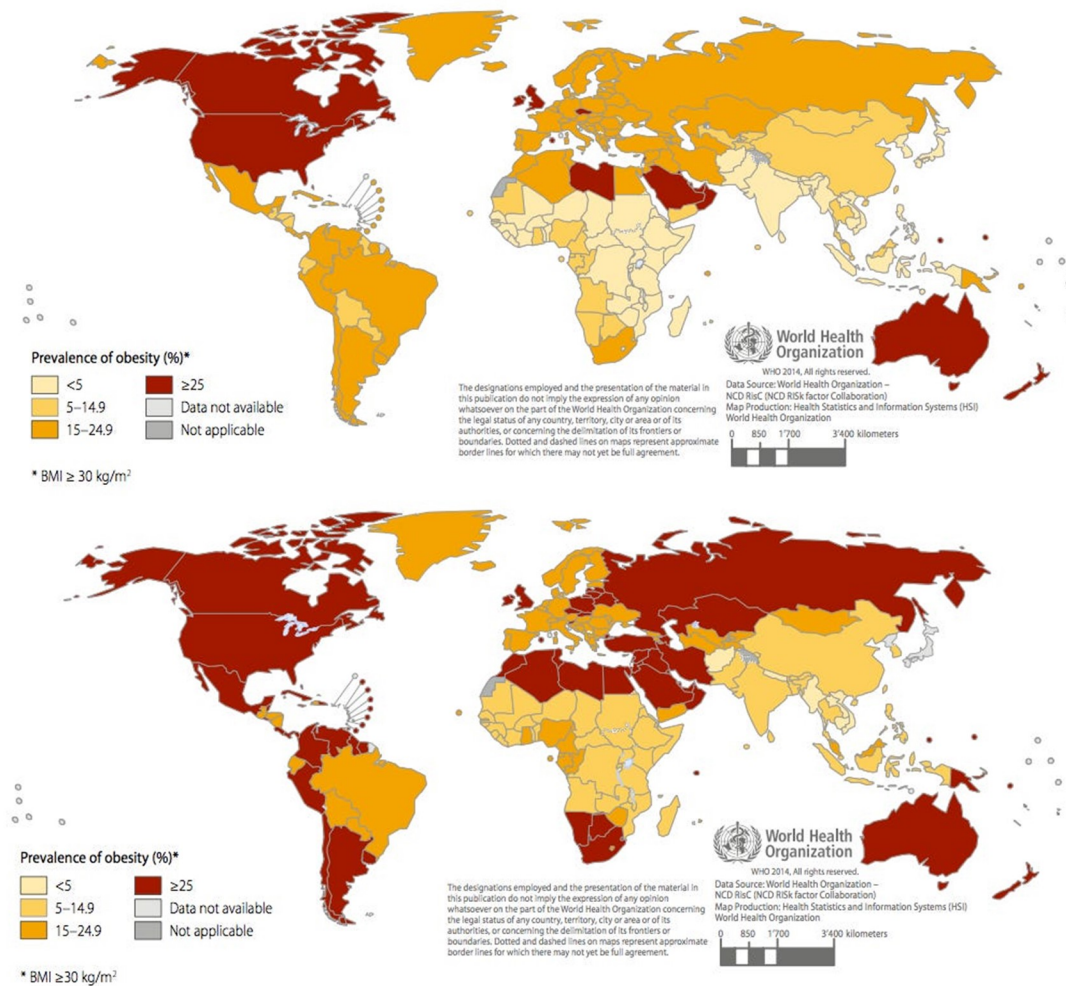
Le surpoids et l'obésité sont définis comme une accumulation anormale ou excessive de masse corporelle représentant un risque pour la santé. L'indice de masse corporelle (IMC) est un calcul qui permet d'estimer le surpoids et l'obésité chez l'adulte. L'IMC se calcule en divisant le poids d'un individu par le carré de sa taille.

$$IMC = \frac{masse(kg)}{taille(m)^2}$$

Pour l'individu adulte, le surpoids est défini par un IMC supérieur ou égal à 25 kg/m<sup>2</sup> et l'obésité par un IMC supérieur ou égal à 30 kg/m<sup>2</sup>. De 35 à 40 kg/m<sup>2</sup>, on parle d'obésité sévère et au-dessus de 40 kg/m<sup>2</sup> d'obésité massive (**Figure 1**).

La prévalence du surpoids et celle de l'obésité ont doublé depuis 1980 au point que près d'un tiers de la population mondiale est considérée en surpoids ou obèse (Reddy, 2016) et la prise de poids excessive est associée à un grand nombre de comorbidités (Chehimi et al., 2017) notamment : le diabète de type 2 (DT2), les pathologies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires chroniques telles que le psoriasis ou la sclérose en plaques, les pathologies musculosquelettiques (Anandacoomarasamy et al., 2008), la maladie d'Alzheimer (Anstey et al., 2011) ou encore certains types de cancers (Basen-Engquist and Chang, 2011). Toutes ces pathologies ont pour effet de diminuer la qualité de vie, la productivité et d'augmenter le coût des soins médicaux. Les coûts direct et indirect attribuables à l'obésité équivaldraient à 0,47-0,61% du PIB en Europe (von Lengerke and Krauth, 2011). Aux États-Unis, ces coûts sont estimés à près de 149,4 milliards de dollars (Kim and Basu, 2016).

D'après l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2016 plus de 1,9 milliards de personnes, de plus de 18 ans, étaient en surpoids et 650 millions étaient considérées comme obèses, soit respectivement 39% et 13% de la population mondiale pour cette tranche d'âge (**Figure 2**). Cette pandémie touche également les enfants puisqu'en 2019, l'OMS estimait que 38,2 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids ou obèses. De plus, pour les enfants entre 5 à 19 ans 340 millions étaient considérés comme obèses ou en surpoids. Le surpoids et l'obésité sont maintenant classés comme 5ème cause de mortalité dans le monde. Plus spécifiquement, en France, une étude très récente menée pour la « Ligue contre l'obésité »



**Figure 2 : Prévalence de l'obésité chez les hommes (en haut) et chez les femmes (en bas) de plus de 18 ans dans le monde, d'après l'OMS en 2014.**

a déterminé qu'en 2020, 47,3% des Français étaient en situation d'obésité et/ou de surpoids dont environ 17 % d'obèses (**Figure 3**). L'obésité massive a notamment doublé de 2009 à 2020 touchant près de 1 million de Français (Etude OBEPI-ROCHE 2020).

Historiquement, l'obésité était un problème touchant principalement les pays développés mais actuellement le surpoids et l'obésité sont également en augmentation dans les pays moins développés. Aujourd'hui, à l'échelle mondiale, le surpoids et l'obésité sont responsables de plus de décès que l'insuffisance pondérale, hormis dans certains pays de l'Afrique subsaharienne et d'Asie.

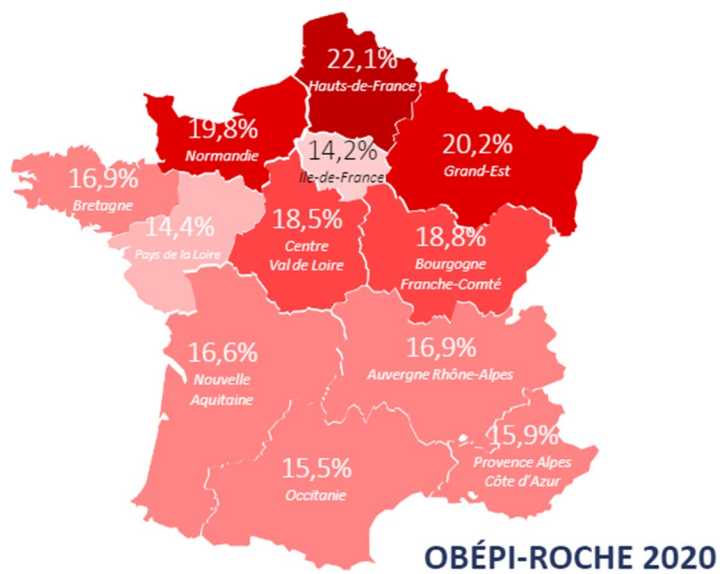
## B. Causes de l'obésité

L'obésité est le résultat d'une balance positive entre apport et dépense énergétique, ce qui entraîne un bilan énergétique positif et conduit à un excès de poids. Ce déséquilibre est en partie due aux nombreux changements de mode de vie, tel qu'observé dans les sociétés industrialisées (**Figure 4**).

Nous pouvons actuellement observer dans les Sociétés occidentales, l'augmentation de la consommation d'aliments bon marché et riches en énergie, tels que les « Fast-food », du grignotage, de la consommation de boissons sucrées et une diminution en apports de fibres, de vitamines et de minéraux.

Au-delà de l'alimentation, notre mode de vie devient également de plus en plus sédentaire. L'utilisation des transports en commun ou de la voiture pour nos déplacements participent à une baisse de nos dépenses énergétiques. De plus, l'augmentation du temps passé devant des écrans comme les jeux-vidéos ou la télévision augmente le risque d'obésité et du DT2 (Boone et al., 2007; Hu et al., 2003). Le manque de sommeil est également lié à une augmentation du poids corporel. Aussi, il a été démontré que la diminution du nombre d'heures de sommeil augmente l'appétit et la faim (Spiegel et al., 2004) et est corrélée à l'IMC (Gangwisch et al., 2005). Enfin, le stress induit un phénomène de compensation par la surconsommation d'aliments riches en acides gras et en sucres (Jääskeläinen et al., 2014).

Les perturbateurs endocriniens, tels que les dioxines, les PCB (Polychlorobiphényle), les phtalates ou encore les bisphénols sont de plus en plus présents dans notre environnement et sont associés au risque d'obésité et du DT2 (Yang et al., 2017). Toutes ces molécules



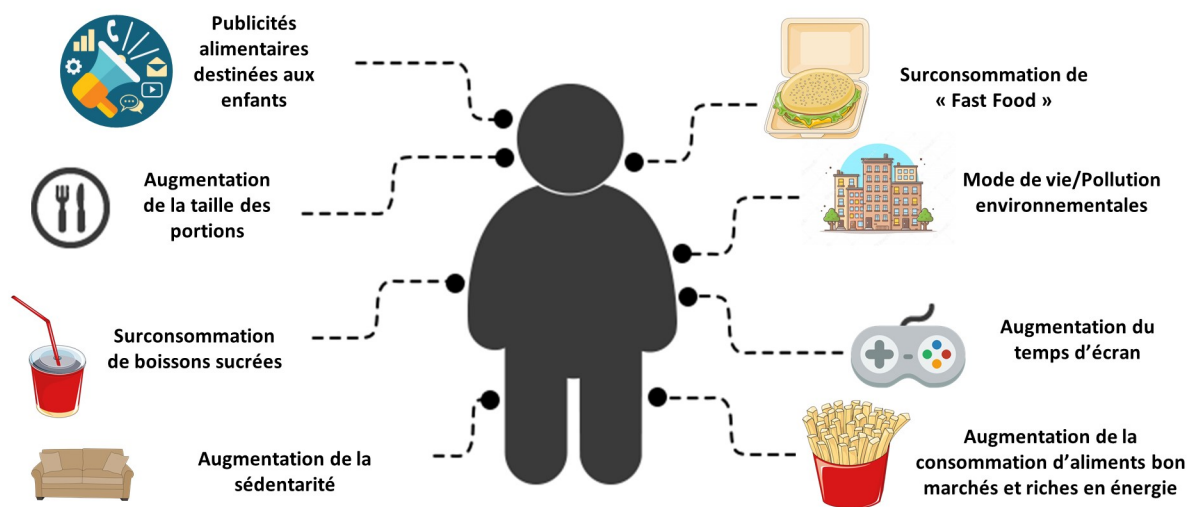
**Figure 3 : Prévalence de l'obésité en France selon les régions en 2020, d'après une étude OBÉPI-ROCHE réalisé pour la Ligue contre l'obésité.**

polluantes interfèrent avec la signalisation hormonale et favorisent la prise de poids, notamment lorsqu'elles sont combinées (Le Magueresse-Battistoni et al., 2018). Le tabac fait également partie des polluants de l'environnement qui participent au développement de l'obésité (Cena et al., 2011).

Parmi les facteurs environnementaux impactant la prise de poids, le microbiote intestinal a également son rôle à jouer. Une dysbiose du microbiote intestinal, qu'elle soit liée à un changement des populations bactériennes ou un déséquilibre des espèces présentes initialement, est associée au développement de l'obésité (Turnbaugh et al., 2006).

Les facteurs génétiques sont également impliqués dans le développement de l'obésité. En effet, prédispositions génétiques et antécédents familiaux augmentent également le risque de devenir obèse. Des études de séquençage à grande échelle du génome (GWAS, genome-wide association studies) ont permis de mettre en évidence plus de 300 loci associés au phénotype obèse (González-Muniesa et al., 2017). Il n'existe donc pas qu'un seul gène de susceptibilité à l'obésité. Sauf dans de rares cas, on parle alors d'« obésité monogénique ». Les causes monogéniques d'obésité restent néanmoins relativement rares et concernent soit le gène de la leptine ou celui de son récepteur, soit le système mélanocortine. Ainsi, une mutation du gène de la leptine ou de son récepteur (dont la prévalence est très faible) est connue pour conduire à une obésité sévère associée à une hyperphagie précoce (Dubern and Clement, 2012). Des mutations de la pro-opiomélanocortine (POMC) ou encore du récepteur 4 à la mélanocortine (MC4R) sont associées à une hyperphagie (Rohde et al., 2019). Au-delà des mutations génétiques, l'épigénétique est connue pour être associée à la mise en place de l'obésité (Herrera et al., 2011). L'épigénétique module l'expression du génome en fonction des paramètres environnementaux. Les mécanismes épigénétiques jouent un rôle tout au long de la vie mais leur impact est d'autant plus important au cours du développement. Des altérations environnementales durant le développement comme un stress nutritionnel maternel (Surnutrition, Obésité, Carence alimentaire) en modifiant les marques épigénétiques peuvent altérer les fonctions cellulaires et tissulaires de la descendance. C'est le concept de la « Developmental Origin of Health and Diseases » (DOHAD) (Gillman, 2005).

Enfin, les comportements sociaux peuvent également contribuer à l'augmentation de la prévalence de l'obésité. En effet, une étude a montré que le risque qu'un individu devienne obèse augmente de 57%, si un de ses amis proches est lui-même obèse. Cet effet a également été observé au sein de couples, si l'un des conjoints devient obèse, la probabilité que l'autre conjoint le devienne également augmente de 37 %. Les auteurs expliquent ce phénomène en partie par



**Figure 4 : Liste non exhaustive des facteurs environnementaux favorisant l'apparition du surpoids et de l'obésité.**

une modification du comportement alimentaire au contact de certaines personnes (Christakis and Fowler, 2007).

### C. Pathologies associées à l'obésité

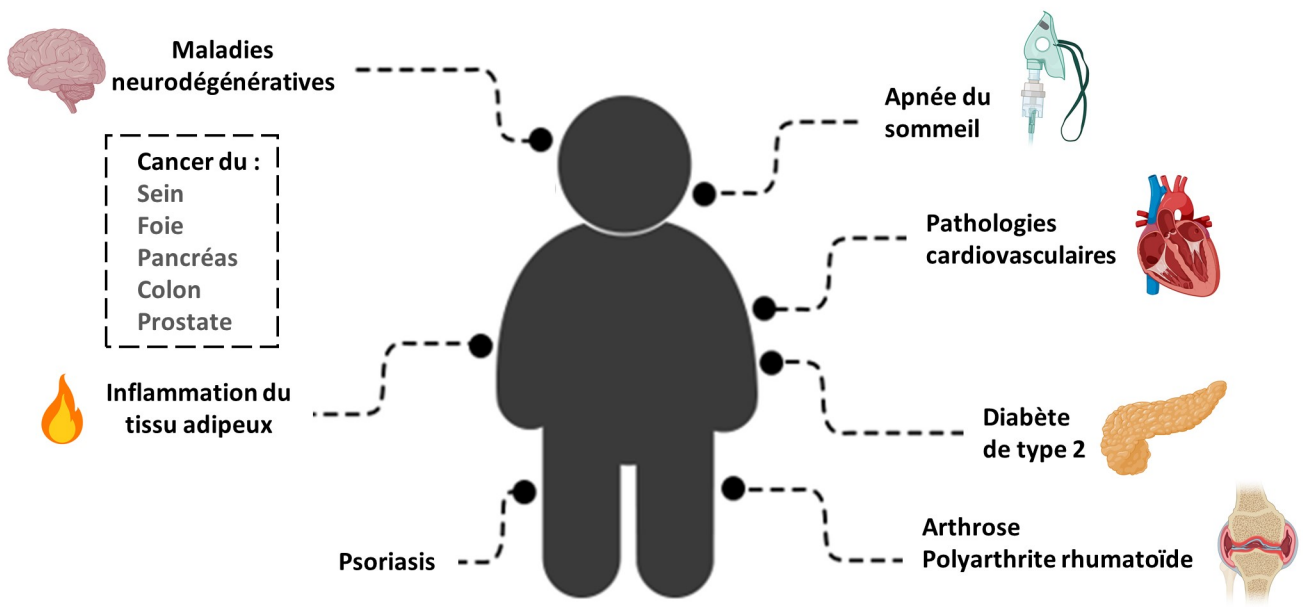
Le déséquilibre énergétique qui conduit à l'obésité engendre un grand nombre de complications. Les comorbidités associées à l'obésité sont nombreuses mais on peut notamment citer : le DT2, l'hypertension artérielle, les pathologies cardiovasculaires, les pathologies musculosquelettiques, les maladies inflammatoires chroniques et/ou auto-immunes, ou encore le cancer. La **figure 5** regroupe les principales comorbidités en lien avec l'obésité.

L'excès de masse corporelle est associé à l'augmentation du risque du syndrome métabolique. Un syndrome métabolique est défini par, au moins trois critères (Alberti et al., 2006).

- Hypertriglycéridémie :  $\geq 1.7$  mmol/l
- Hypercholestérolémie : HDL cholestérol  $< 1,03$  mmol/l (homme) ;  $< 1,29$  mmol/l (femme)
- Hypertension artérielle :  $\geq 130/85$  mmHg
- Tour de taille élevé :  $> 94$  cm (homme) ;  $> 80$  cm (femme)
- Hyperglycémie à jeun :  $\geq 5,6$  mmol/l

Ce syndrome métabolique peut par la suite conduire à des pathologies comme le DT2 et augmenter le risque des complications.

Parmi ces critères se trouve le tour de taille. Il a été démontré qu'un tour de taille élevé est prédicteur d'une résistance à l'insuline, on parle d'état de prédiabète (Haghighatdoost et al., 2017). Le DT2 est une pathologie qui se développe progressivement. Dans un premier temps, l'apport élevé en glucose conduit à une production excessive d'insuline afin de réguler au mieux la glycémie. La surstimulation des cellules sensibles à l'insuline (foie, muscle, tissu adipeux) conduit à une diminution de leur réponse à l'insuline puis à une insulino-résistance conduisant à l'impossibilité de faire rentrer le glucose dans les cellules cibles. La glycémie n'est donc plus régulée et entraîne une hyperglycémie chronique. Par la suite, les cellules  $\beta$  pancréatiques, qui produisent l'insuline, augmentent leur quantité de production, jusqu'à épuisement. L'hyperglycémie associée à un épuisement des cellules  $\beta$  pancréatiques conduit au DT2. Les



**Figure 5 : Liste non exhaustive des comorbidités associées à l'obésité.**

principaux critères du DT2 sont une glycémie à jeun supérieure à 1,26g/L lors de deux mesures, ou une glycémie supérieure à 2g/L à n'importe quel moment. En 2014 le nombre d'individus adultes diabétiques atteignait 422 millions soit 1 personne sur 11 adultes. Le DT2 représente près de 90% des cas de diabète dans le monde, dû principalement à une surcharge pondérale et donc possiblement évitable (OMS, 2016).

L'obésité ainsi que le DT2, représentent également des facteurs de risque majeurs pour les pathologies cardiovasculaires. Les maladies cardiovasculaires associées à l'obésité sont notamment l'hypertension artérielle, l'insuffisance coronarienne, ou encore les accidents vasculaires cérébraux. Toutes ces pathologies sont généralement dues à une dyslipidémie qui est associée à l'obésité. Cette dyslipidémie participe à l'athérosclérose responsable notamment d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux. D'ailleurs, de façon intéressante, il a été démontré que l'IMC est corrélé au risque d'infarctus du myocarde et ce, même en l'absence de syndrome métabolique (Thomsen and Nordestgaard, 2014).

L'obésité est également un facteur de risque important pour la stéatohépatite non alcoolique. Cette pathologie est caractérisée par une accumulation de graisses hépatiques associées à une inflammation. En effet, au cours de l'obésité, l'abondance de lipides et de sucres dans la circulation participent à la formation de dépôts ectopiques de tissu adipeux, notamment au niveau du foie. La stéatohépatite non alcoolique peut conduire à une fibrose puis à une cirrhose (Polyzos et al., 2019).

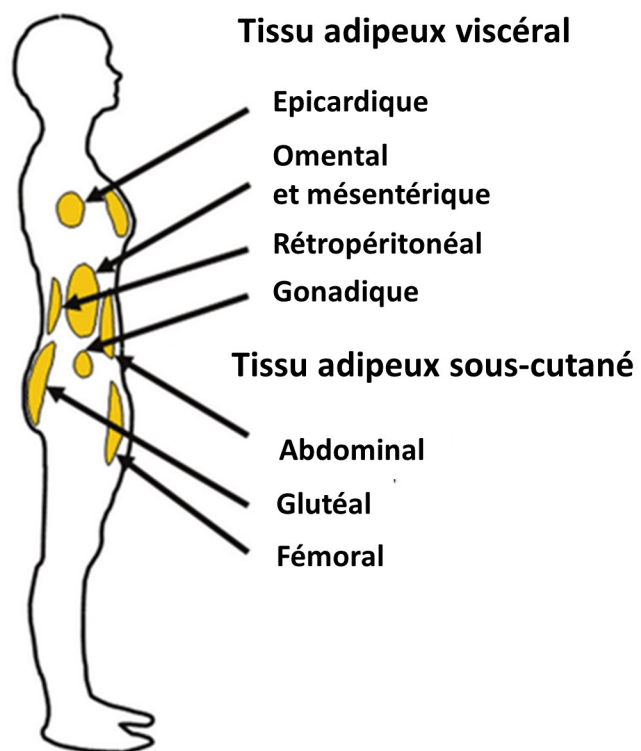
L'obésité augmente également le risque de cancer. En effet, il a été établi une corrélation entre le risque de cancer et un IMC élevé. Une étude prospective sur plus de 900 000 individus a démontré qu'un IMC  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>, augmente la mortalité de toutes les causes de cancer de 62 % pour les Hommes et 52% pour les Femmes par rapport à un IMC normal (Calle et al., 2003). Un IMC élevé est également corrélé à une augmentation du risque de développer des cancers de l'œsophage, de l'estomac (Levi et al., 2018), du côlon, du rectum, du foie, de la vésicule biliaire, du pancréas (Li et al., 2009), des reins, du sein (Key et al., 2003) mais également certains lymphomes non hodgkiniens et myélome multiple (Pi-Sunyer, 2009). Le lien entre obésité et cancer est, entre autres, dû aux adipokines pro-inflammatoires sécrétées par le tissu adipeux au cours de l'obésité. Nous détaillerons d'ailleurs ces adipokines dans un prochain chapitre. L'insulinorésistance et l'hyperinsulinémie, souvent retrouvés chez les sujets présentant une obésité favorisent également le développement du cancer. En effet, l'insuline est une hormone pro-mitotique et anti-apoptotique, ce qui favorise le développement de tumeurs (Gupta et al., 2002).



L'obésité est associée à une inflammation chronique de bas grade avec notamment la production au niveau du tissu adipeux de cytokines et d'adipokines pro-inflammatoires. De ce fait, l'obésité est connue pour aggraver les maladies inflammatoires chroniques. Aussi dans la polyarthrite rhumatoïde, la prévalence de la polyarthrite est corrélée à l'augmentation de l'IMC (Crowson et al., 2013; Feng et al., 2019). De plus, il a été démontré que l'obésité est un facteur de risque de la sclérose en plaques (Gianfrancesco and Barcellos, 2016) et entraîne une plus faible réponse aux traitements dans cette pathologie (Huppke et al., 2019). L'obésité est également un facteur de risque important du psoriasis. En effet, durant l'obésité une augmentation des acides gras libres circulants est observée, ces mêmes acides gras sont impliqués dans la pathogenèse du psoriasis (Kunz et al., 2019).

Enfin, il fut un temps supposé que l'obésité pourrait également être un facteur aggravant pour des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. En effet, certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'interleukine-6 (IL-6), le « Tumor necrosis factor- $\alpha$  » (TNF- $\alpha$ ) ou encore des dérivés réactifs de l'oxygène sont impliqués dans la progression de ces maladies. Ces mêmes facteurs pro-inflammatoires sont retrouvés augmentés durant l'obésité et seraient donc impliqués dans l'aggravation de ces pathologies neurodégénératives (Mazon et al., 2017). Néanmoins, une étude récente à très grande échelle portant sur 3,6 millions de personnes remet en cause cette hypothèse. En effet, les auteurs ont montré que l'augmentation de l'IMC n'est pas corrélée avec la gravité des pathologies neurodégénératives. A l'inverse un IMC inférieur à 18,5 (sous poids) est corrélé avec un risque accru de décès, suite au développement de ces pathologies et augmente également le risque de dépression (Bhaskaran et al., 2018).

Au cours de l'obésité, le tissu adipeux subit de multiples modifications tant fonctionnelles que structurelles, ce qui pourrait en partie expliquer les comorbidités associées. Dans les chapitres suivants nous détaillerons la structure et la fonction du tissu adipeux sain ainsi que les modifications que subit ce dernier durant l'inflammation liée à l'obésité.



**Figure 6 : Localisation des dépôts de tissu adipeux blanc, chez l'Homme.**

## II. Le tissu adipeux blanc sain et pathologique

Chez l'Homme adulte, le tissu adipeux peut être classifié en trois catégories : le tissu adipeux blanc, qui représente 95 % de la masse de tissu adipeux, le tissu adipeux brun (1 à 2 %) et enfin le tissu adipeux beige. Ce dernier est difficilement quantifiable car il correspond à des groupes de cellules incluses dans le tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux blanc est le principal site de stockage d'énergie à long terme, alors que le tissu adipeux brun et beige exercent un rôle dans la régulation thermique (Frayn et al., 2003).

Le tissu adipeux blanc est capable de stocker de grandes quantités d'énergie et ce, sous forme de triglycérides (TG). Ces réserves sont utilisées lors de périodes de jeûne ou d'effort physique prolongé par exemple, quand les réserves glucidiques viennent à s'épuiser. Néanmoins, depuis plusieurs années, suite à la découverte de la leptine (Friedman et al., 1991; Zhang et al., 1994), le tissu adipeux blanc n'est plus considéré comme un simple tissu de stockage mais également comme un tissu endocrine à part entière.

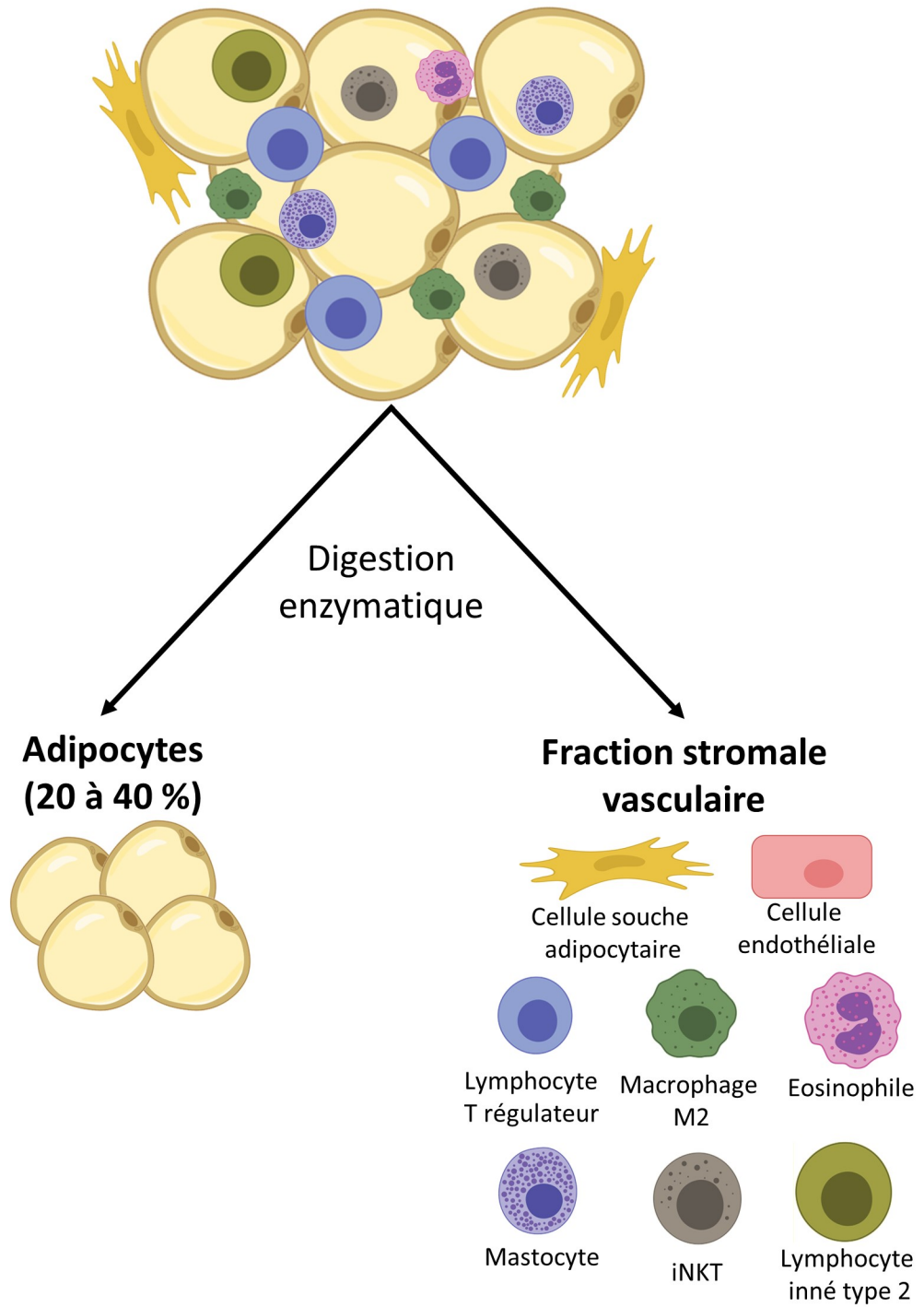
### A. Localisation et composition du tissu adipeux blanc

#### La localisation du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc représente entre 15 et 20 % de la masse corporelle chez l'homme et 20 à 25 % chez la femme. Il peut être séparé en deux catégories : le tissu adipeux blanc viscéral (TAVis) et le tissu adipeux sous cutané (TAsc). Le premier est composé du tissu adipeux omental, mésentérique, rétropéritonéal, gonadique et péricardique (Wajchenberg, 2000). Le TAsc, lui, est localisé comme son nom l'indique sous la peau, autour des hanches, des fesses (Glutéal), des cuisses (Fémoral), des bras et de l'abdomen (**Figure 6**).

La localisation des différents dépôts de TA est importante puisque selon cette dernière les propriétés du tissu adipeux sont différentes. Le TAsc est le principal site de stockage d'énergie sous forme d'acide gras puisqu'il correspond à 80 % du stock de masse grasse à l'état physiologique (Lee et al., 2013), le TAVis est donc un organe de stockage secondaire. L'expansion du TAsc est considérée durant l'obésité comme protectrice (L. E. Gyllenhammer et al., 2016), alors que l'expansion du TAVis est liée à un risque accru de développer des complications métaboliques telles que le DT2 et les pathologies cardiovasculaires (Després and

Tissu adipeux du sujet mince



**Figure 7 : Composition du tissu adipeux blanc chez l'Homme.**

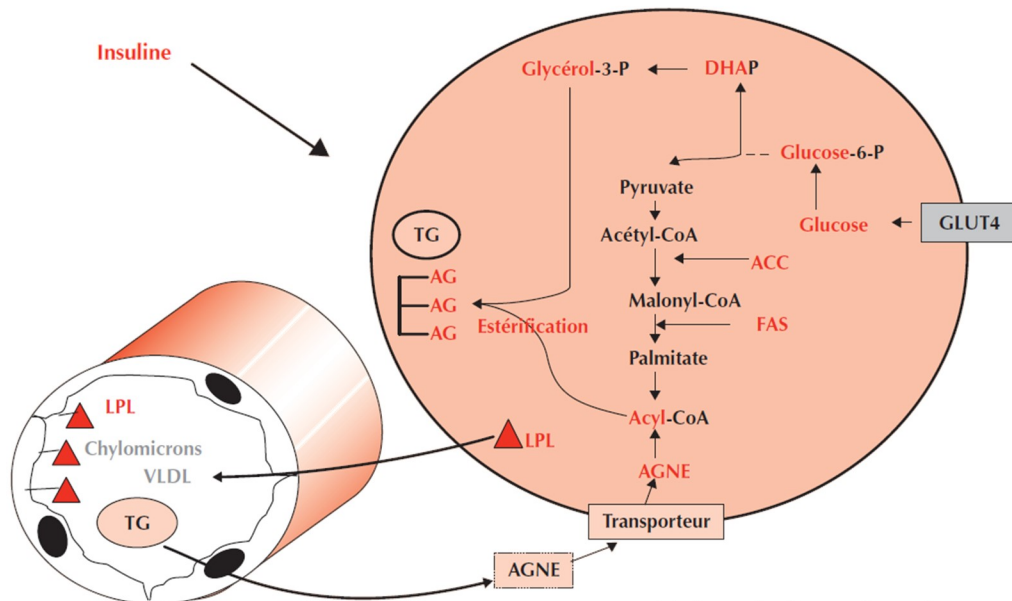
Lemieux, 2006). En effet, le TAsc a une meilleure propension au stockage des TG de façon durable limitant ainsi le relargage d'acides gras libres et donc de dépôts ectopiques de tissu adipeux (Carobbio et al., 2017). Cette capacité est liée à une capacité de différenciation plus importante des cellules progénitrices du TAsc (adipogenèse) (Macotela et al., 2012) et à une sensibilité moins importante à la lipolyse (Lafontan and Langin, 2009).

### La composition du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc était à l'origine, considéré comme un tissu homogène composé en grande partie par des adipocytes blancs. Néanmoins, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence son hétérogénéité. En effet, seulement 20 à 40 % des cellules du tissu adipeux sont des adipocytes et près de 60 à 80 % des cellules sont non adipocytaires (Tsiloulis and Watt, 2015). La digestion du tissu par l'emploi d'enzymes telles que la collagénase permet de mettre en évidence la fraction vasculaire stromale (SVF), qui regroupe les cellules non adipocytaires (Rodbell, 1964). La SVF est composée de cellules progénitrices (pré-adipocytes, cellules souches adipocytaires (CSA), de cellules du compartiment vasculaire (péricytes, cellules endothéliales) et de cellules immunes (macrophages, neutrophiles, mastocytes, éosinophiles, cellules dendritiques, cellules lymphoïdes innées, lymphocytes T, de lymphocytes B et iNKT) (**Figure 7**). Nous verrons dans le chapitre suivant comment l'obésité induit une altération de nombre et de la qualité de toutes les cellules composants et infiltrants le TA, tant au niveau de leur taille, leur fonction ou encore de leur sous-type. Le tissu adipeux est organisé sous forme de lobules constitués de stroma et délimités par une matrice extracellulaire, le septa. Le stroma contient notamment les pré-adipocytes exprimant MSCA1 et dont le nombre augmente durant l'obésité au sein du TAsc de manière plus importante que dans le TAVIS (Estève et al., 2019).

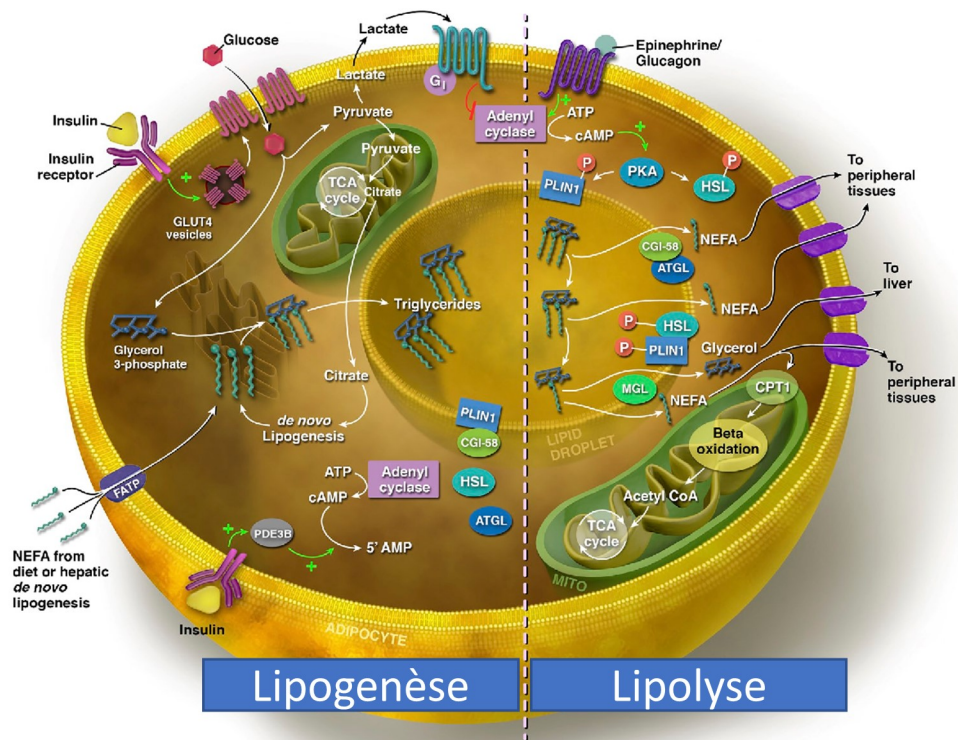
L'adipocyte blanc est spécialisé dans l'accumulation de lipides. Les adipocytes matures sont des cellules sphériques constituées principalement d'une unique grosse gouttelette lipidique composée de TG et d'un petit noyau localisé sur le bord de la cellule. Leurs principales fonctions sont : la lipogenèse à partir de glucose et d'acides gras libres non estérifiés (AGNE), ainsi que la lipolyse qui permet de libérer trois acides gras libres plus une molécule de glycérol. Les adipocytes ainsi que les cellules de la SVF sont également capables de sécréter des adipokines exerçant des fonctions endocrines. Nous allons maintenant détailler les fonctions du tissu adipeux blanc.

**A**



(Adapté d'après Fève and Mercier, 2007)

**B**



**Figure 8 : Synthèse et lyse des triglycérides dans l'adipocyte blanc.**

(Adapté d'après Rutkowski et al., 2015)

## B. Fonctions du tissu adipeux blanc

### La lipogenèse

La synthèse des TG nécessite deux substrats principaux ; les acyl-CoenzymeA (CoA) et le glycérol-3-phosphate dont les précurseurs métaboliques sont les AGNE et le glucose. Les AGNE circulants sont transportés par des lipoprotéines (Chylomicrons et VLDL). Au niveau du tissu adipeux blanc, les AGNE présents dans les lipoprotéines sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), présente dans l'endothélium vasculaire et dont l'activité est stimulée par l'insuline (Merkel et al., 2002). Les AGNE entrent ensuite dans l'adipocyte. Néanmoins, les AGNE ne peuvent pas diffuser de façon passive à travers la membrane plasmique. Ils sont captés par des transporteurs ancrés à la membrane : la protéine CD36 (Abumrad et al., 1993) responsable de la majorité de l'entrée des AGNE (Ibrahimi and Abumrad, 2002) et la protéine de transport des acides gras (Fatty acid transport protein, FATP) (Schaffer and Lodish, 1994). Une fois présent dans le cytosol, les AGNE sont transportés par les protéines FABP4/aP2 qui sont codées par le gène FABP4 (Baxa et al., 1989). Les AGNE sont ensuite métabolisés en Acyl-CoA par l'Acyl-CoA synthase et estérifiés en TG via l'ajout d'un glycérol-3-phosphate. La synthèse de TG nécessite 3 AGNE et 1 glycérol-3-phosphate, la molécule de TG est ensuite stockée au sein de la gouttelette lipidique de l'adipocyte (Fève and Mercier, 2007) (**Figure 8A**). Le glycérol-3-phosphate provient quant à lui du glucose circulant. Il entre dans les adipocytes via le transporteur de glucose 4 (GLUT4) membranaire. L'absorption du glucose dans la cellule est stimulée par l'insuline qui induit la translocation du transporteur GLUT4 intracellulaire vers la membrane (Leto and Saltiel, 2012). Une fois dans l'adipocyte, le glucose donne du glycérol-3-phosphate, après avoir été phosphorylé par l'hexokinase pour donner du glucose-6-phosphate, induisant alors la synthèse de métabolites intermédiaires le fructose-6-phosphate, puis le fructose-1,6-bisphosphate, et le dihydroxyacétone phosphate. La lipogenèse est régulée positivement par l'insuline car en plus d'induire la translocation du GLUT4 vers la membrane, elle active et induit l'expression de la LPL (Fried et al., 1993) et stimule l'expression et la translocation à la membrane du FATP (Stahl et al., 2002).

### La lipolyse

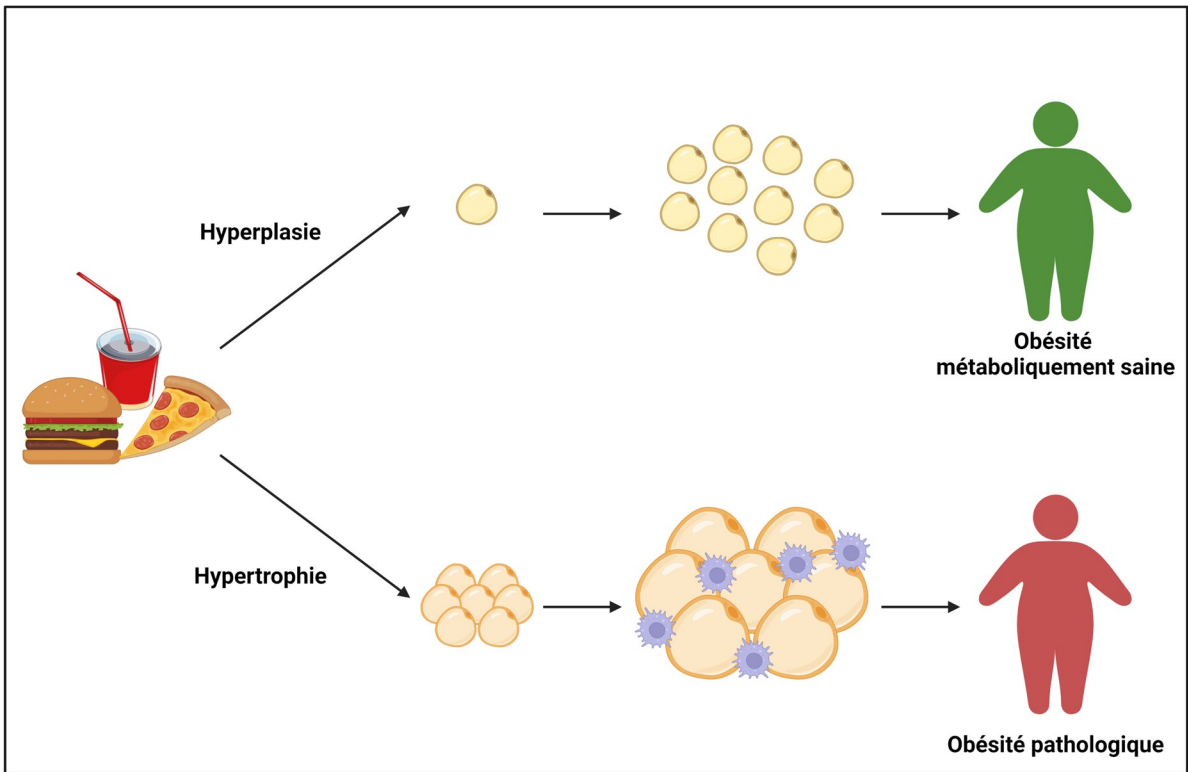
A l'inverse, la lipolyse permet la libération des AGNE par hydrolyse des TG de la gouttelette lipidique (Duncan et al., 2007). Les TG sont hydrolysés par l'action de trois lipases l'« Adipose triglyceride lipase » produisant du diacylglycérol, puis l'« hormone-sensitive lipase » hydrolysant le diacylglycérol en monoacylglycérol et enfin la « monoacylglycerol



lipase » catalysant la synthèse d'un acide gras libre et d'un glycérol. Au total trois AGNE et une molécule de glycérol sont produits. Les AGNE libérés se retrouvent ensuite dans la circulation et sont utilisés par d'autres organes pour produire de l'énergie via notamment la  $\beta$ -oxydation (Rutkowski et al., 2015). La lipolyse est stimulée intensément par le jeûne via l'action des catécholamines et du glucagon et elle est inhibée par l'insuline, notamment en période post-prandiale (Duncan et al., 2007) (**Figure 8B**). De plus chez les primates, mais pas chez les rongeurs, il a été démontré que le peptide natriurétique peut également réguler la lipolyse via l'action d'une PKG (Lafontan and Langin, 2009).

### C. L'expansion du tissu adipeux

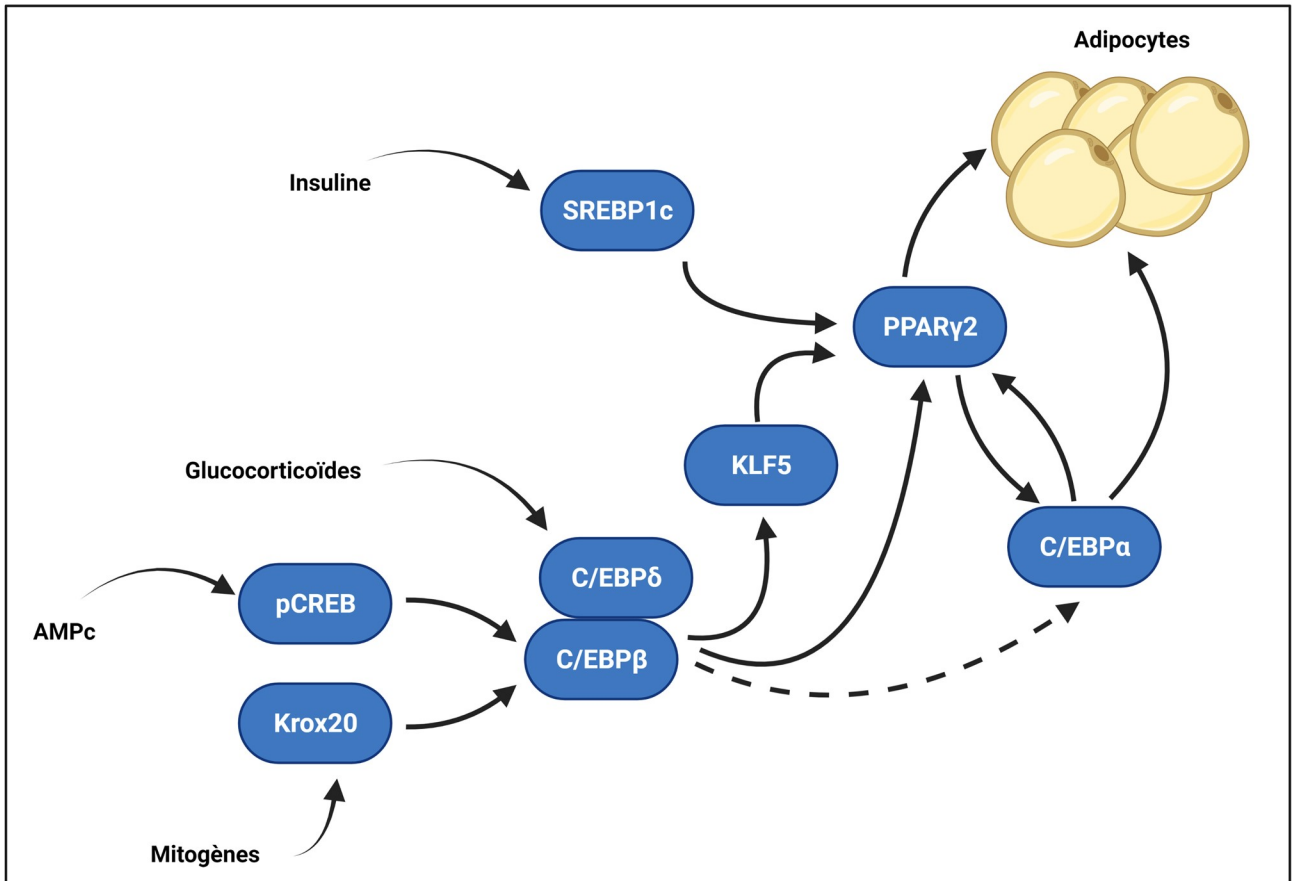
Les adipocytes sont des cellules matures, qui ne peuvent plus se diviser. Ainsi pour augmenter le nombre d'adipocytes, leurs précurseurs doivent se différencier, il s'agit du mécanisme d'adipogenèse. Elle implique une forte prolifération des précurseurs adipocytaires qui par la suite vont pouvoir se différencier en adipocytes matures, ce qui est décrit sous le terme d'hyperplasie. L'expansion du tissu adipeux par hyperplasie est liée à un stockage des acides gras qui n'induirait pas de complications métaboliques. C'est ce phénomène qui est observé chez les patients obèses « métaboliquement sain » quand leur TAsc s'expand. L'hyperplasie chez l'adulte est observable au sein du TAsc alors que le TAvic répond à une augmentation des apports énergétiques, préférentiellement via l'hypertrophie de ses adipocytes, conduisant à des complications métaboliques. Lorsque les capacités d'hyperplasie du TAsc sont saturées, le TAvic prend alors le relais via l'hypertrophie (Vishvanath and Gupta, 2019). Ces deux phénomènes, hyperplasie et hypertrophie sont définis comme le remodelage du tissu adipeux (Choe et al., 2016). L'hypertrophie du tissu adipeux est associée à une augmentation de l'hypoxie du fait de l'augmentation de la taille des adipocytes réduisant la vascularisation. Les adipocytes fortement hypertrophiques émettent des signaux de danger du fait de l'hypoxie, ce qui induit une infiltration par des cellules immunitaires et une inflammation du tissu adipeux et la mort par apoptose des adipocytes. La libération des acides gras dans le sang, suite à la mort des adipocytes, provoque la formation de dépôts ectopiques de tissu adipeux notamment au niveau musculaire, hépatique et cardiaque. Ces dépôts ectopiques participent à la mise en place des comorbidités associées à l'obésité. Ainsi, la présence dans le tissu adipeux d'adipocytes



**Figure 9 : Les deux voies d'expansion du tissu adipeux blanc.**

hypertrophiques est associée au risque d'altérations métaboliques (Hoffstedt et al., 2010). (Figure 9).

Les cellules précurseurs des adipocytes sont les cellules souches adipocytaires. Elles sont d'origine mésenchymateuse et s'engagent dans l'adipogenèse par différenciation en adipoblastes, puis en pré-adipocytes et enfin en adipocytes (Gesta et al., 2007). La première étape est l'engagement des CSA vers la lignée adipocytaire. Elle nécessite une signalisation par BMP2 et BMP4 et génère des pré-adipocytes. La seconde étape est la différenciation, au sens strict, des pré-adipocytes vers les adipocytes matures. Les pré-adipocytes sont caractérisés notamment par l'expression de CD36 (Gao et al., 2017) ainsi que MSCA1 (Estève et al., 2015) chez l'Homme. L'adipogenèse est particulièrement étudiée depuis la mise à disposition de la lignée cellulaire murine 3T3 de fibroblastes pouvant se différencier en adipocytes (Green and Kehinde, 1975). Cette lignée a permis de faire des avancées majeures sur la description de l'adipogenèse. Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- $\gamma$ ), est le pivot central de l'adipogenèse (Rosen et al., 1999). PPAR- $\gamma$  régule la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'adipogenèse. Néanmoins, il ne peut agir seul. Les facteurs de transcription de la famille « CCAAT/enhancer binding protein » (C/EBP) possèdent également un rôle très important dans l'adipogenèse. En effet, l'expression des facteurs C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  augmente dans les pré-adipocytes ce qui va augmenter l'expression de PPAR- $\gamma$  dans les premiers temps de l'adipogenèse. PPAR- $\gamma$  est par la suite capable d'induire l'expression de C/EBP $\alpha$  qui par une boucle de rétrocontrôle positive maintient l'expression de PPAR- $\gamma$ . Cette boucle d'activation positive est importante pour une différenciation terminale des adipocytes matures. En effet, dans des cellules déficientes en PPAR- $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  n'est pas capable à lui seul de promouvoir la différenciation, ce qui démontre le rôle majeur de PPAR- $\gamma$ . A l'inverse, des cellules déficientes en C/EBP $\alpha$  sont capables de se différencier mais la différenciation n'est pas complète. En effet, dans ces cellules, l'accumulation de lipides est défectueuse (Moseti et al., 2016). Cette boucle d'activation positive permet l'expression de gènes spécifiques des adipocytes matures, comme FABP4, ADIPOQ, GLUT4, ou encore la LPL (Vu et al., 1996). L'adipogenèse nécessite plusieurs facteurs tels que l'insuline, les glucocorticoïdes et les mitogènes, qui aboutissent tous à l'activation de PPAR- $\gamma$  et de C/EBP $\alpha$  (Farmer, 2006) (Figure 10). Au cours de l'adipogenèse, les pré-adipocytes expriment AP2 et GLUT4, leur permettant de former des gouttelettes



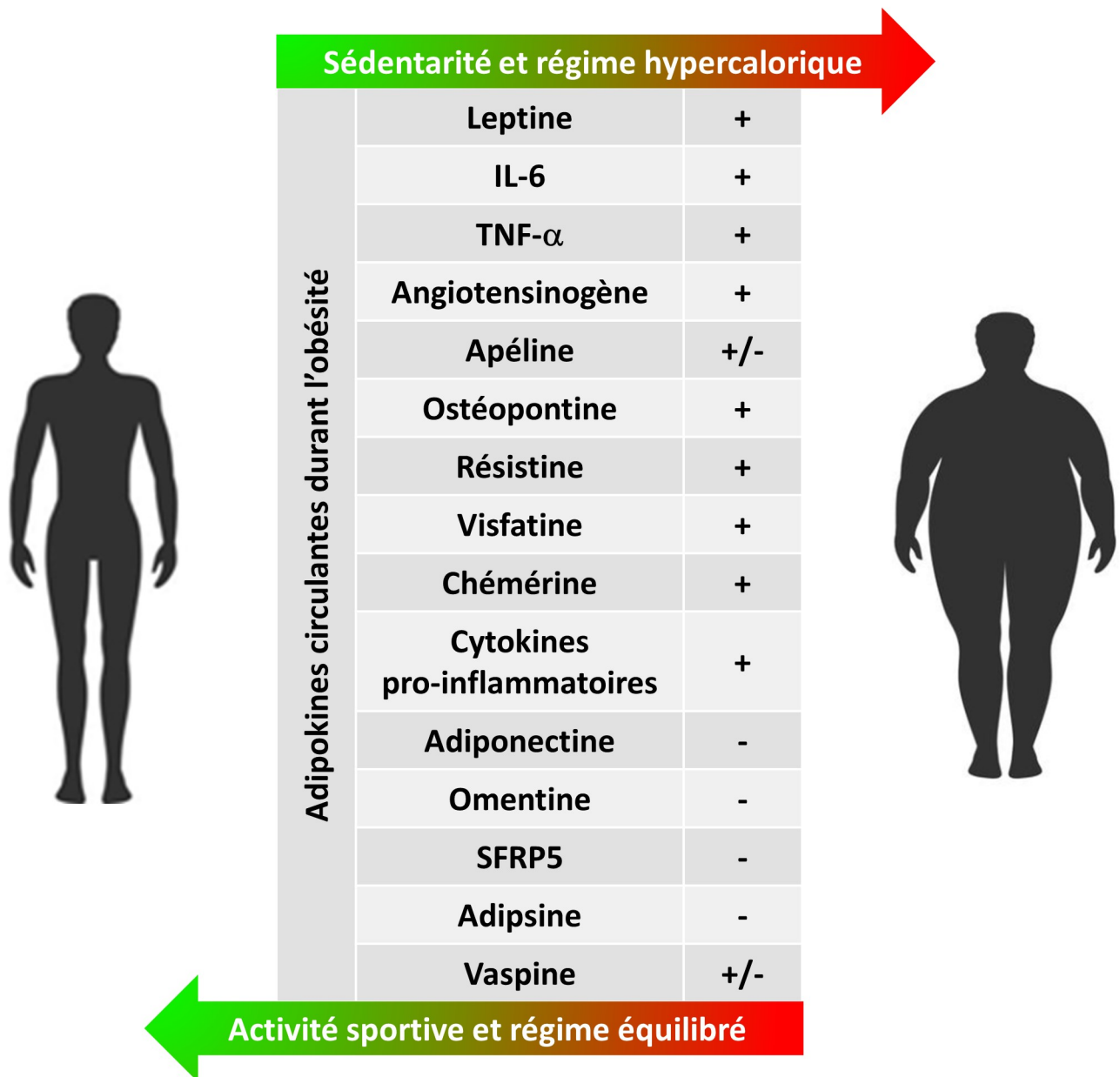
**Figure 10 : Cascade d'activation impliquée dans la régulation de l'adipogenèse.**

*(Adapté d'après Farmer, 2006.)*

lipidiques. Ces gouttelettes lipidiques vont finir par fusionner pour former une seule grosse gouttelette caractéristique des adipocytes matures (Ghaben and Scherer, 2019).

#### D. L'hétérogénéité des progéniteurs adipocytaires

Les CSA font partie des progéniteurs adipocytaires. Néanmoins, le terme progéniteur englobe différentes sous-populations de cellules présentes dans le TA. En effet, ce terme regroupe les CSA qui sont les progéniteurs les moins engagés mais également les pré-adipocytes qui sont les plus engagés dans l'adipogenèse. Une étude récente utilisant la technique de « single cell RNA-seq » a permis de mettre en évidence plusieurs sous-populations de cellules progénitrices que ce soit chez la souris ou chez l'Homme (Merrick et al., 2019). Ainsi ces auteurs ont démontré l'existence de trois sous-populations. Une population exprimant la « dipeptidyl peptidase-4 » (DPP4) et qui est retrouvée au niveau interstitiel. Les progéniteurs DPP4+ sont des cellules multipotentes et très prolifératives, elles possèdent ainsi plusieurs caractéristiques des CSM. Les auteurs ont également retrouvé une population CD142+ et une population ICAM1+, toutes deux localisées entre les adipocytes. Ces deux populations sont plus engagées dans l'adipogenèse et sont moins prolifératives que les cellules DPP4+. Après la mise en évidence de ces populations, les auteurs les ont transplantées *in vivo*. Ceci leur a permis de démontrer que les cellules DPP4+ sont les précurseurs des cellules CD142+ et ICAM1+ et que ces deux dernières populations peuvent s'interconvertir *in vivo*. Au cours de l'obésité, la proportion de progéniteurs DPP4+ diminue et celle des progéniteurs CD142+ et ICAM1+ augmente. Néanmoins ces deux dernières populations perdent leur potentiel adipogénique. D'autres auteurs ont confirmé l'existence de ces sous-populations (Schwalie et al., 2018). Schwalie et son équipe ont également décrit trois sous-populations de précurseurs qui s'apparentent aux précurseurs DPP4+, ICAM1+ et CD1421+. Néanmoins, ils ont également décrit une population CD142+ et Abcg1+ plus abondante dans le TAVis que le TASC et capable d'inhiber l'adipogenèse. De plus, le nombre de ces précurseurs augmente dans le tissu adipeux de souris *Ob/Ob*. Une autre équipe a également classifié les progéniteurs dans trois catégories mais cette fois selon le niveau d'expression du CD34. Les progéniteurs n'exprimant pas CD34 seraient à l'origine des adipocytes beiges. Ceux l'exprimant faiblement seraient à l'origine d'adipocytes blancs mais ayant une capacité de stockage des lipides et de lipolyse limitée. Inversement les cellules exprimant fortement CD34 peuvent stocker les lipides et ont une activité lipolytique importante. De plus, leur nombre augmente dans le TAVis et le TAsc de sujets diabétiques par rapport à des sujets sains (Raajendiran et al., 2019).



**Figure 11 : Modification de l'expression en adipokine du tissu adipeux blanc durant l'obésité (liste non exhaustive).**

Ainsi la modification de l'abondance de ces progéniteurs dans le tissu adipeux au cours de l'obésité et/ou le DT2, ainsi que les différences d'abondances entre TAVis et TAsc pourrait peut-être expliquer les différences de plasticité entre ces deux tissus en présence d'une balance énergétique positive.

## E. La fonction sécrétoire du tissu adipeux blanc

Longtemps considéré comme un simple site de stockage, les découvertes dans les années 90 de la leptine (Friedman et al., 1991; Zhang et al., 1994) et quelques années plus tard de l'adiponectine (Scherer et al., 1995) ont démontré que le tissu adipeux blanc est un tissu endocrine à part entière, communiquant avec d'autres organes. Par la suite, de nombreuses cytokines et hormones produites par le tissu adipeux, nommées adipokines, ont été décrites. Grâce à l'utilisation de techniques de protéomique, plus de 600 molécules potentiellement sécrétées par le tissu adipeux ont été identifiées (Lehr et al., 2012). L'expansion du tissu adipeux observé au cours de l'obésité induit une modification du profil des adipokines sécrétées par le tissu adipeux. L'altération de la sécrétion de ces adipokines participe au développement du syndrome métabolique et aux comorbidités associées à l'obésité (**Figure 11**).

### Les adipokines pro-inflammatoires

#### La leptine

En 1950 a été montrée l'existence d'une espèce de souris devenant obèses de façon spontanée, ce sont les souris *ob/ob* (Ingalls et al., 1950). 41 ans plus tard, Friedman et son équipe ont identifié le gène de la leptine, dont les souris *ob/ob* sont déficientes. Cette protéine de 16kDa est capable de diminuer l'appétit et d'augmenter la dépense énergétique et ce, via l'activation de récepteurs présents au niveau hypothalamique (Friedman, 2016). En effet, la leptine est capable d'activer les neurones de type POMC, qui libèrent de la mélanocortine responsable de la satiété en inhibant la libération des neuropeptides orexigènes (Cowley et al., 2001). Le récepteur de la leptine est un récepteur cytokinique de type I, exprimé dans de nombreux types cellulaires au niveau du système nerveux central, mais également en périphérie.

Chez le sujet mince, la leptine a un effet insulino-sensibilisant en réduisant les dépôts de graisse ectopique (Muoio et al., 1997) et en augmentant l'oxydation des acides gras libres (Shimabukuro et al., 1997) mais l'obésité est associée à une résistance à la leptine elle-même, secondaire à une hyperleptinémie. La résistance à la leptine se traduit par l'incapacité de la leptine à diminuer la prise alimentaire ainsi que le poids corporel. Elle est retrouvée chez le sujet obèse mais également chez le patient atteint de lipodystrophie (Kershaw and Flier, 2004). Au cours de l'obésité, l'hyperleptinémie participe à l'inflammation de bas grade observée chez l'obèse. En effet, la leptine induit la prolifération des monocytes, augmente leur phagocytose et leur production de cytokines et chimiokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ ; IL-6 ; IL-12, MCP-1) et des dérivés réactifs de l'oxygène. De plus, la leptine favorise la polarisation des lymphocytes T naïfs en T helper 1 (Th1) et en T helper 17 (Th17). Du fait de toutes ces actions, la leptine augmente le risque de comorbidités associées à l'obésité (Pérez-Pérez et al., 2020).

### L'interleukine 6

L'interleukine-6 (IL-6) est sécrétée par les adipocytes, mais surtout par les cellules de la SVF. Il a été démontré que le TAVisc sécrète 2 à 3 fois plus d'IL-6 que le TAsc. Le niveau sérique d'IL-6 est augmenté chez les patients obèses en comparaison aux minces (Huber et al., 2008). L'IL-6 augmente la résistance à l'insuline au niveau hépatique (Sabio et al., 2008) mais également musculaire et adipocytaire (Rotter et al., 2003). De plus, l'IL-6 stimule la lipolyse et induit également une inhibition de l'adipogenèse (Almuraikhy et al., 2016). L'effet de l'IL-6 sur l'insulino-résistance a été démontré chez la souris via l'injection d'IL-6. De plus, l'injection d'anticorps neutralisant l'IL-6 chez des souris obèses améliore de manière significative l'action de l'insuline au niveau hépatique (Klover et al., 2005).

### TNF- $\alpha$

Le TNF- $\alpha$  provenant du tissu adipeux est sécrété par les cellules de la SVF (Fain et al., 2004), notamment les lymphocytes T et les macrophages de type 1. Le TNF- $\alpha$  est augmenté chez les sujets en situation d'obésité (Maury and Brichard, 2010). En effet, la quantité de TNF- $\alpha$  est corrélée à la quantité de tissu adipeux (Zahorska-Markiewicz et al., 2000) mais également à l'insulinémie et la résistance à l'insuline (Kern et al., 2001). De plus, le TNF- $\alpha$  est un inhibiteur de l'adipogenèse, qui elle-même est inhibée durant l'obésité. Il a été démontré que le TNF- $\alpha$  participe à la résistance à l'insuline induite par l'obésité (Hotamisligil et al., 1995), via les voies de signalisation, JNK, IKKb/NF- $\kappa$ B et la libération de facteurs de stress du réticulum

endoplasmique. Il participe donc à la mise en place de l'inflammation de bas grade présente dans l'obésité.

### IL-1 $\beta$

L'IL1- $\beta$  est principalement sécrétée par les macrophages du tissu adipeux. Elle est capable d'inhiber la différenciation adipocytaire (Gagnon et al., 2013), la signalisation de l'insuline au niveau des adipocytes, ainsi que le transport du glucose, augmentant ainsi la résistance à l'insuline des adipocytes (Bing, 2015).

### Autres adipokines pro-inflammatoires

D'autres adipokines sécrétées par le tissu adipeux participent également à l'inflammation du tissu adipeux et la résistance à l'insuline.

L'expression de l'ostéopontine est retrouvée fortement augmentée chez des souris rendues obèses mais également chez des sujets en état d'obésité, en comparaison aux sujets minces (Kiefer et al., 2008). Il a été démontré que la délétion du gène de l'ostéopontine induit une diminution de l'infiltration du tissu adipeux par les macrophages chez des souris rendues obèses (Kiefer et al., 2010). Enfin, la déplétion génique de l'ostéopontine induit également une baisse de l'expression dans le tissu adipeux d'IL-6, de TNF- $\alpha$ , ou encore de MCP-1 (Nomiya et al., 2007), ce qui prouve le rôle de l'ostéopontine dans l'inflammation du tissu adipeux. Cette déplétion améliore de surcroît la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline de ces souris.

La résistine est un polypeptide sécrété par les macrophages résidant du tissu adipeux (Steppan et al., 2001). Son niveau sérique est augmenté chez les sujets obèses et il est corrélé à l'IMC (Lazar, 2007) mais également à la masse de TAVis et TAsc (Jain et al., 2009; Won et al., 2009). La résistine induit la surexpression de TNF $\alpha$ , d'IL-6, d'IL-12 et de MCP-1 via l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. De plus, le niveau circulant de résistine est corrélé au niveau de la protéine C réactive, du TNF $\alpha$  et de l'IL-6, que ce soit dans la population générale ou chez les patients atteints de DT2, d'athérosclérose ou encore de maladie rénale chronique (Park et al., 2017).

La visfatine est une adipokine sécrétée par les adipocytes et les macrophages (Fukuhara et al., 2005). Elle se retrouve également augmentée au cours de l'obésité et du DT2 et le niveau de visfatine est corrélé à la résistance à l'insuline (Taşkesen et al., 2012). Cependant, une autre

étude a montré une réduction de la concentration plasmatique de visfatine liée à l'obésité mais pas à la résistance à l'insuline (Pagano et al., 2006). Par conséquent, la corrélation entre les niveaux plasmatiques de visfatine et les troubles métaboliques, tels que le DT2 n'est toujours pas clairement établie.

La chémérine semble également jouer un rôle dans la réduction de la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose. Son expression est retrouvée augmentée chez les sujets présentant une obésité (Chakaroun et al., 2012) et corrélée à la quantité de TAVis, à la pression artérielle et au niveau de cholestérol plasmatique (Shin et al., 2012).

### **Les adipokines anti-inflammatoires**

#### **L'adiponectine**

L'adiponectine est exprimée majoritairement par les adipocytes mais son expression a également été mise en évidence dans d'autres tissus : dans le muscle squelettique, les cardiomyocytes, les ostéoblastes, les glandes surrénales, le placenta, les testicules et les ovaires (Nguyen, 2020). L'adiponectine induit une augmentation de la sensibilité à l'insuline, elle augmente également l'entrée de glucose en induisant la translocation membranaire de GLUT4. Au niveau hépatique, elle inhibe la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Enfin, elle augmente l'oxydation des acides gras musculaires et l'accumulation de triglycérides dans les adipocytes (Nguyen, 2020). Chez le sujet sain, l'adiponectine est retrouvée à des concentrations jusqu'à 1000 fois supérieures à celles de la leptine (Whitehead et al., 2006). De plus, de façon opposée à la leptine, la concentration sérique d'adiponectine est drastiquement diminuée chez les sujets obèses et/ou DT2 (Fang and Judd, 2018). L'adiponectine circulante est retrouvée sous trois formes ; trimérique, hexamérique ou multimérique. La forme de haut poids moléculaire (HMW) a été montrée comme étant la forme la plus apte à augmenter la sensibilité à l'insuline (Aso et al., 2006). Le ratio HMW/adiponectine totale, est un puissant prédicteur de la sensibilité hépatique à l'insuline chez les rongeurs et les humains (Pajvani et al., 2004). L'adiponectine possède également des propriétés anti-inflammatoires notamment durant le DT2, la stéatose hépatique non alcoolique et les pathologies cardiovasculaires (Gil-Campos et al., 2004; Ouchi et al., 2003; Pischon et al., 2004). En effet, l'adiponectine inhibe la différenciation des macrophages et induit la polarisation de ces derniers vers un phénotype anti-inflammatoire (M2) sécrétant de l'IL-10. Elle inhibe également l'expression de TLR4 (Fang and Judd, 2018).

De plus, elle inhibe l'expression de TNF- $\alpha$  au sein du tissu adipeux et celle de la CRP hépatique (Ouchi et al., 2003). L'adiponectine a aussi un effet anti-inflammatoire sur les cellules endothéliales en diminuant l'expression des molécules d'adhésion (« InterCellular Adhesion Molecule-1 » ICAM-1, «Vascular cell adhesion protein 1 » VCAM-1) et sur les cardiomyocytes et les fibroblastes en diminuant l'expression de TNF- $\alpha$  et l'apoptose (Holland et al., 2011). De ce fait, l'adiponectine possède un rôle protecteur dans les pathologies cardiovasculaires associées à l'obésité et est considérée comme insulino-sensibilisante.

### L'omentine

L'omentine ou Intelectine 1 est une adipokine sécrétée par la SVF du tissu adipeux viscéral omental (Yang et al., 2006). Au cours de l'obésité, l'expression de l'omentine diminue. De plus, son expression est inversement corrélée au tour de taille, à l'IMC et/ou à l'insulinémie à jeun (de Souza Batista et al., 2007). Inversement, l'expression de l'omentine augmente dans les cas de régime amaigrissant (Moreno-Navarrete et al., 2010). *In vitro* l'omentine augmente la captation du glucose par activation de la voie de signalisation Akt (Yang et al., 2006). L'omentine a un rôle anti-inflammatoire, anti-oxydant et augmente la sensibilité à l'insuline. Son effet anti-inflammatoire passe par l'inhibition d'expression de la cyclooxygénase 2 (COX-2) induite par le TNF- $\alpha$ , notamment dans les cellules endothéliales (Yamawaki et al., 2011).

### L'adipsine

L'adipsine a été découverte en 1987 (Cook et al., 1987), elle est aussi connue sous le nom de facteur D du complément. L'adipsine est exprimée et sécrétée principalement par le tissu adipeux (Xiaobo Wu et al., 2018). Chez la souris rendue obèse, le niveau circulant d'adipsine diminue de façon progressive au cours du temps. L'adipsine aurait un rôle protecteur vis-à-vis de la fonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques. En effet, des souris déficientes en adipsine présentent une intolérance au glucose due à une insulinopénie. Les îlots pancréatiques provenant de ces souris présentent une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Lo et al., 2014). D'un point de vue mécanistique, le facteur du complément C3a est activé par l'adipsine et augmente la sécrétion d'insuline en réponse au glucose via un récepteur calcique dépendant de C3a. Les mêmes auteurs ont démontré que des patients diabétiques de



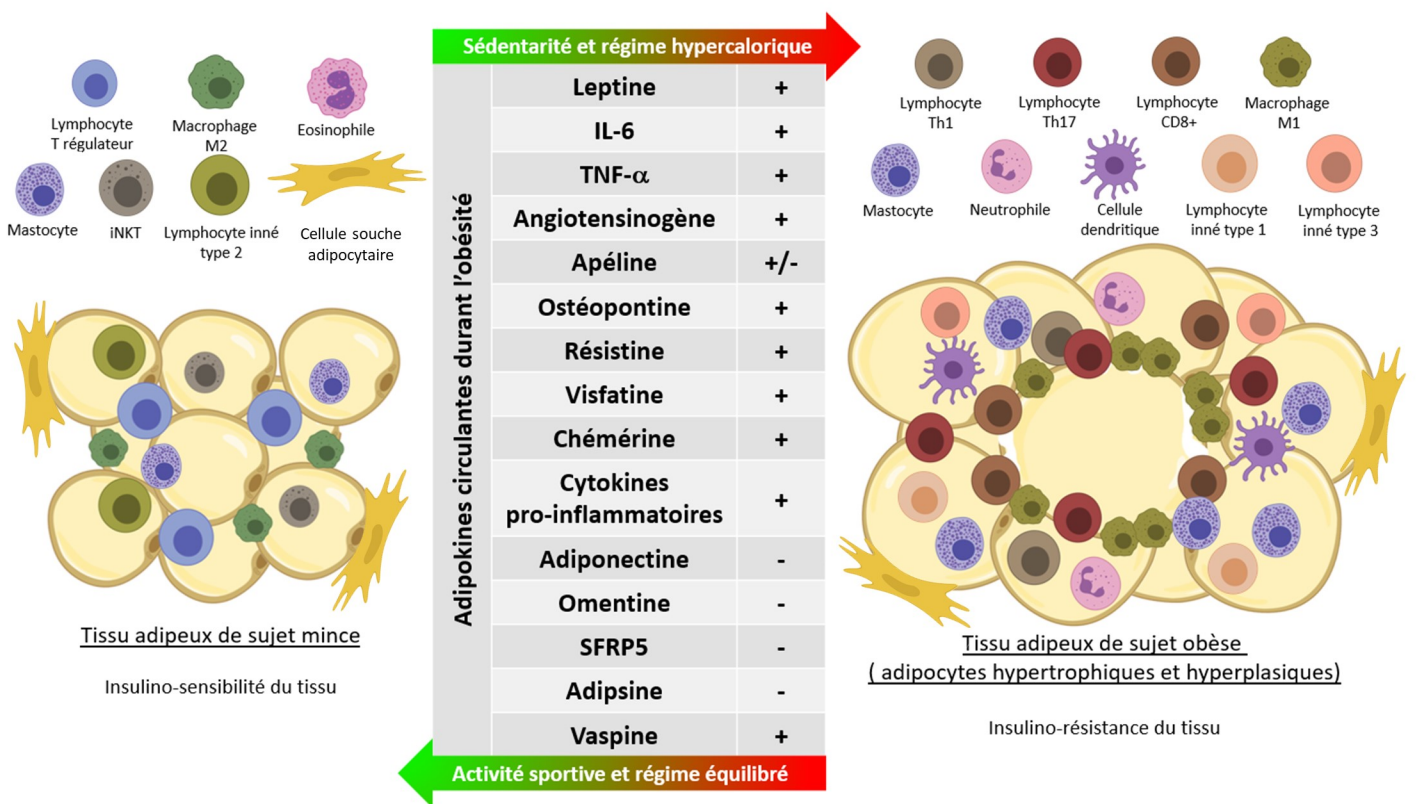
type 2 ayant un déficit en cellules  $\beta$ -pancréatiques sont déficients en adiposine. Ces résultats indiquent que la voie adiposine/C3a relie la fonction adipocytaire à la physiologie des cellules  $\beta$  (Lo et al., 2014).

### La vaspine

La « Visceral adipose tissue-derived serpin » (vaspine) fait partie des membres de la famille des inhibiteurs de sérine protéase. Elle est notamment exprimée par les adipocytes matures du TAVis (Wada, 2008). La concentration sérique de vaspine est retrouvée élevée chez les sujets obèses et/ou atteints de DT2, en comparaison aux sujets minces (Feng et al., 2014). Néanmoins, l'administration de vaspine recombinante chez la souris rendue obèse améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline (Wada, 2008). De plus, la vaspine réduit de manière importante la prise alimentaire en diminuant l'expression du neuropeptide Y et en augmentant l'expression de la POMC au niveau hypothalamique (Brunetti et al., 2011). Les effets bénéfiques observés sur le métabolisme glucidique seraient liés à la capacité de la vaspine, à inhiber la protéase kallikrein 7, capable de cliver et dégrader les chaînes A et B de l'insuline. L'inhibition de la kallikrein 7 par la vaspine inhibe la dégradation de l'insuline (Heiker et al., 2013). De fait, un traitement par injection de vaspine pourrait conduire à une amélioration du métabolisme glucidique chez le sujet obèse et/ou DT2.

En résumé, les adipokines ont des activités à la fois pro ou anti-inflammatoires, et l'équilibre entre les différentes adipokines est important pour l'homéostasie du tissu adipeux et de l'organisme. Lors du développement de l'obésité, le remodelage que subit le tissu adipeux aboutit à un bouleversement de son activité sécrétoire. Les adipokines pro-inflammatoires voient leur sécrétion globalement augmenter à l'inverse des adipokines anti-inflammatoires. Les adipokines pro-inflammatoires participent alors à l'initiation de l'inflammation locale et systémique retrouvées dans l'obésité et contribuent aux comorbidités associées à l'obésité.

Cependant certaines adipokines ont encore un rôle mal défini. C'est le cas notamment de l'apéline. Cette adipokine est sécrétée par l'adipocyte et par les cellules de la SVF, notamment les macrophages. Les données recueillies à ce jour ont montré que l'apéline agit au niveau hypothalamique jouant un rôle dans la prise alimentaire, le stress aigu, et exerce une



**Figure 12 : Infiltration du tissu adipeux par les cellules de l'immunité chez le sujet mince et obèse.**

activité de type antidépresseur (Yang et al., 2019). Néanmoins son augmentation ou sa diminution, et le rôle de cette variation durant l'obésité ne sont pas encore clairement établis.

### III. Inflammation et infiltration du tissu adipeux blanc au cours de l'obésité

#### A. Les cellules de l'immunité impliquées dans l'inflammation du tissu adipeux

Près de 60 % des cellules du tissu adipeux, sont contenues dans la SVF et parmi les cellules de la SVF, on retrouve une part importante de cellules immunitaires. A l'état physiologique (en dehors de l'obésité) le tissu adipeux contient des cellules immunitaires anti-inflammatoires qui participent à l'homéostasie du tissu adipeux en favorisant notamment la sensibilité à l'insuline via l'activation de la sécrétion d'adiponectine, entre autres. Au sein du tissu adipeux non pathologique sont retrouvés majoritairement : i) des macrophages de type M2 qui sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-4 ou encore TGF- $\beta$ ), ii) des lymphocytes T-helper 2 (Th2) qui sécrètent de l'IL-10, de l'IL-4 et de l'IL-13, iii) des lymphocytes T régulateurs (Treg) iv) des éosinophiles qui sécrètent près de 90 % de l'IL-4 (Wu et al., 2011), v) des lymphocytes innés de type 2 qui permettent le recrutement des éosinophiles et la polarisation des macrophages vers le sous-type M2 (Molofsky et al., 2013).

Au cours de l'obésité, les populations de cellules immunitaires présentes dans le tissu adipeux sont remplacées par des cellules immunitaires pro-inflammatoires. Une diminution des Treg, Th2 et des macrophages M2 est observée durant l'obésité. Alors que des monocytes/macrophages sont recrutés et polarisés en macrophage de type M1. Ceux-ci sécrètent de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$ , notamment. Des polynucléaires neutrophiles, des mastocytes sont également recrutés. Les lymphocytes B sont amplifiés et participent à la polarisation des macrophages M1. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques sont les premiers à infiltrer le tissu adipeux obèse. Puis des lymphocytes CD4+ (Th1 et Th17) ainsi que des cellules dendritiques (Huh et al., 2014). Des lymphocytes innés de type 1 et 3. L'ensemble de ces cellules immunitaires pro-inflammatoires participent au développement de l'inflammation chronique de bas grade et de la résistance à l'insuline. (**Figure 12**).

La modification des populations cellulaires présentes dans le tissu adipeux au cours de la mise en place de l'obésité, s'accompagne également d'une modification des voies métaboliques mises en jeu au sein des cellules immunes, modifiant ainsi les fonctions de ces dernières, c'est l'immunométabolisme. Par exemple, les macrophages M2, et les Tregs utilisent principalement le cycle de Krebs et l'oxydation des acides gras pour produire de l'ATP. A l'inverse, les macrophages M1, les lymphocytes T helpers et les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques nécessitent une diminution de l'oxydation des acides gras pour être activés. De plus, ces mêmes cellules utilisent la glycolyse comme source d'ATP. L'activation de la voie glycolytique dans ces cellules est nécessaire à la production de cytokines pro-inflammatoires, et participe à l'activité de phagocytose des macrophages M1 ainsi qu'à la prolifération des lymphocytes T helpers (O'Neill et al., 2016). La modification des voies métaboliques étant nécessaire à l'activation des cellules immunes pro-inflammatoires, le ciblage de ces voies pourrait permettre de moduler l'inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité.

### **Les macrophages**

Les macrophages de type M2 sont localisés dans les espaces interstitiels entre les adipocytes. Dans le TAsc des sujets minces, les macrophages M2 représentent 10 % des cellules (Weisberg et al., 2003). Les macrophages M2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TGF- $\beta$ , l'IL-4 et l'IL-13 (Murray and Wynn, 2011; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Ils inhibent l'inflammation et participent à la réparation tissulaire et à la résolution de l'inflammation. Du fait de la production d'IL-10, les macrophages M2 jouent également un rôle important dans la sécrétion d'adiponectine par les adipocytes, participant ainsi au maintien de l'insulino-sensibilité du tissu adipeux. Ils augmentent également la thermogenèse du tissu adipeux et l'adipogenèse beige via la sécrétion de catécholamines (Nguyen et al., 2011; Qiu et al., 2014). L'obésité déséquilibre la balance M1/M2 par le recrutement massif de macrophages M1 (Chylikova et al., 2018; Lumeng et al., 2008). Au niveau transcriptionnel, les macrophages M1 et M2 sont caractérisés par l'expression d'IRF5 ou IRF4, respectivement. IRF5 et IRF4 sont en compétition pour la liaison à la protéine adaptatrice MyD88 associée à TLR4 qui médie la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. De fait, l'équilibre entre IRF4 et IRF5 semble être un déterminant majeur de la polarisation des macrophages M1 versus M2. Les macrophages M1 expriment des niveaux élevés d'IRF-5 qui médie non seulement l'expression de cytokines pro-inflammatoires,

mais supprime également l'expression d'IL-10. A l'inverse, IRF4 peut inhiber la polarisation des macrophages M1, et ainsi favoriser la polarisation des macrophages M2. De fait, IRF4 induit l'expression d'IL-10 et d'IL-4. Il a été montré que la délétion de IRF5 empêche la transition entre macrophages M2 vers M1 chez les souris soumises à un régime hypercalorique durant la mise en place de l'obésité, ce qui entraîne une expansion limitée du tissu adipeux viscéral ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline (Dalmas et al., 2015)

Chez l'Homme, l'IMC et la taille des adipocytes sont corrélés au nombre de macrophages M1 présents au sein du tissu adipeux (Canello et al., 2006). L'augmentation du nombre de macrophages est principalement due à une infiltration de monocytes depuis la circulation sanguine (Nagareddy et al., 2014). En effet, l'obésité modifie les sécrétions en adipokines mais également en chimiokines du tissu. Les chimiokines telles que MCP-1 (CCL2), CCL3, CCL5, CCL9 et M-CSF ainsi que leur récepteurs sont augmentés durant l'obésité dans le tissu adipeux et dans la circulation (Devèvre et al., 2015; Tourniaire et al., 2013). L'expression de MCP-1 est induite par des adipokines pro-inflammatoires telles que la leptine ou encore la résistine. De plus, MCP-1 est sécrétée par les adipocytes hypertrophiques présents dans le tissu adipeux obèse. De surcroît, les macrophages M1 déjà présents au sein du tissu adipeux sécrètent eux aussi MCP-1, favorisant le recrutement d'autres macrophages et créant ainsi une boucle d'auto-amplification du nombre de M1. L'expression du récepteur de MCP-1, CCR2, augmente durant l'obésité et son rôle dans l'insulino-résistance a été démontré par son blocage pharmacologique. Ce blocage a en effet amélioré la résistance à l'insuline chez des souris rendues obèses par surnutrition (Weisberg et al., 2006).

De surcroît, l'expansion massive du tissu adipeux du fait de l'hypertrophie des adipocytes et de l'angiogenèse inadaptée, favorise l'hypoxie et la nécrose des adipocytes. L'hypoxie via la surexpression de HIF-1 $\alpha$  induit la surexpression d'IL-6, de la leptine et également de MCP-1 par les adipocytes (Quintero et al., 2012), favorisant ainsi l'insulinorésistance du tissu et augmentant encore le recrutement de monocytes/macrophages. L'hypertrophie des adipocytes associée à l'hypoxie induit des phénomènes de nécrose des adipocytes, du fait de l'activation des lymphocytes CD8<sup>+</sup>. Les macrophages sont des cellules spécialisées dans la phagocytose. Au sein du tissu adipeux obèse, les macrophages ont pour rôle de phagocyter les adipocytes nécrotiques. Ceci aboutit à la formation de « structures en couronne », composées d'adipocytes nécrotiques entourés par un amas de lymphocytes CD8 et de macrophages (Cinti et al., 2005; Murano et al., 2008). Au niveau de ces structures, les

macrophages fusionnent pour former un syncytium gorgé de lipides, caractéristique de l'inflammation chronique du tissu adipeux (Cinti et al., 2005). Une étude a montré que les macrophages résidents sont capables de proliférer au sein du tissu adipeux augmentant ainsi l'accumulation des macrophages. D'ailleurs, dans cette étude, les auteurs suggèrent que ce sont ces macrophages qui participent au recrutement des monocytes circulants (Zheng et al., 2016).

Les macrophages M1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-12 et l'IL-23, participant ainsi à la polarisation des lymphocytes Th1 et Th17. De plus, ces cytokines participent à l'inhibition de l'adipogenèse, ainsi qu'à la diminution d'expression de GLUT4, ce qui favorise l'insulinorésistance (Lumeng et al., 2008). L'insulinorésistance est d'autant plus exacerbée que ces cytokines stimulent la phosphorylation d'IRS-1 au niveau de la sérine 307, inhibant la réponse à l'insuline. Enfin, les AGNE saturés relargués par les adipocytes peuvent servir de ligands pour TLR4, activant ainsi la réponse inflammatoire et le recrutement et la prolifération des macrophages dans d'autres tissus ou organes tels que le foie et conduisant ainsi, à la stéatose hépatique (Kanda et al., 2006). Cette accumulation de macrophages ne semble pas irréversible puisque, la baisse de poids chez des patients en état d'obésité morbide grâce à une chirurgie bariatrique diminue la quantité de macrophage M1 dans le tissu adipeux (Canello et al., 2005). Le resvératrol est un polyphénol également capable de diminuer la polarisation des macrophages en M1, chez des souris soumises à un régime hypercalorique (Shabani et al., 2020).

Néanmoins, la classification « classique » M1/M2 ne décrit pas toute l'hétérogénéité des macrophages retrouvés dans le tissu adipeux au cours de l'obésité. Une équipe a mis en évidence une population de macrophages pro-inflammatoires activée par des acides gras libres saturés. Les auteurs ont nommé ces macrophages, « macrophages métaboliquement activés » (Kratz et al., 2014). Ils ont par ailleurs mis en évidence l'accumulation de ces macrophages dans le TAVis et le TAsc chez l'Homme et la souris au cours de l'obésité. Les macrophages métaboliquement activés ont des effets délétères dans les stades précoces d'obésité. En effet, ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6) et ils participent ainsi à l'insulinorésistance du tissu. A l'inverse à un stade avancé de l'obésité, ils participent à la clearance des adipocytes nécrotiques ce qui permet de diminuer le relargage des lipides dans la circulation (Coats et al., 2017). Les auteurs ont démontré que l'activation de ces macrophages est sous le contrôle de la NADPH oxydase 2 (NOX2). La délétion de cette enzyme améliore l'insulinorésistance de souris soumises à un régime hypercalorique de 8 semaines, en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires. Néanmoins, cette même délétion induit une

diminution de la clearance des adipocytes dans le TA de souris soumises à un régime de 16 semaines, aggravant le phénotype de ces souris. Ainsi les macrophages métaboliquement activés ont des effets à la fois bénéfiques et délétères dépendant du temps de régime obésogène.

### Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC), sont des cellules présentatrices d'antigène dites « professionnelles ». Elles jouent un rôle fondamental dans l'immunité innée et l'immunité adaptative, en participant au recrutement des macrophages, à l'activation des lymphocytes T et à leur polarisation vers différentes sous-populations ainsi qu'à la mise en place de la mémoire immunitaire et de la tolérance immunitaire (Kapsenberg, 2003).

Les DC sont présentes dans l'ensemble des tissus de l'organisme, préférentiellement dans les barrières épithéliales. Les DC sentinelles sont immatures et suite à un stimulus perçu comme un signal de danger, les DC subissent un processus de maturation, qui leur permet de surexprimer des molécules de costimulation (CD80/86, CD40) et des molécules du CMH I/II (de Jong et al., 2005). Suite à cette maturation, les DC migrent vers les ganglions afin de présenter aux lymphocytes T ces antigènes (Merad et al., 2013).

Une augmentation des DC dans le tissu adipeux de souris soumises à un régime hypercalorique a été démontrée. En effet, chez ces souris une augmentation des cellules CD11c+ a été décrite, ces cellules correspondent aux DC dont le nombre augmente. Les mêmes auteurs ont démontré le rôle essentiel des DC dans le recrutement des macrophages au sein du tissu adipeux de ces souris (Stefanovic-Racic et al., 2012). Ils ont également mis en évidence, via l'utilisation de souris Knockout, le rôle de « FMS-like tyrosine kinase 3 ligand » (FLT3L) dans l'augmentation de la fréquence des DC et le recrutement des macrophages. FLT3L est une molécule cruciale dans le développement des DC (Shortman and Naik, 2007). Une autre équipe a mis en évidence chez la souris et chez l'Homme obèse un nouveau sous-type de DC qu'ils ont prénommé DC inflammatoire. Ces DC inflammatoires sont capables *in vitro* d'induire la polarisation des lymphocytes en Th17, alors que des DC contrôles provenant de souris minces, induisent la polarisation plutôt en Th1 (Bertola et al., 2012). D'autres auteurs ont démontré que les DC dans le tissu adipeux des souris obèses sécrètent plus d'IL-6, de TGF- $\beta$  et d'IL-23 que les DC de la rate de ces mêmes souris. Cette sécrétion cytokinique est connue pour participer à l'induction de la polarisation des Th17 (Chen et al., 2014).



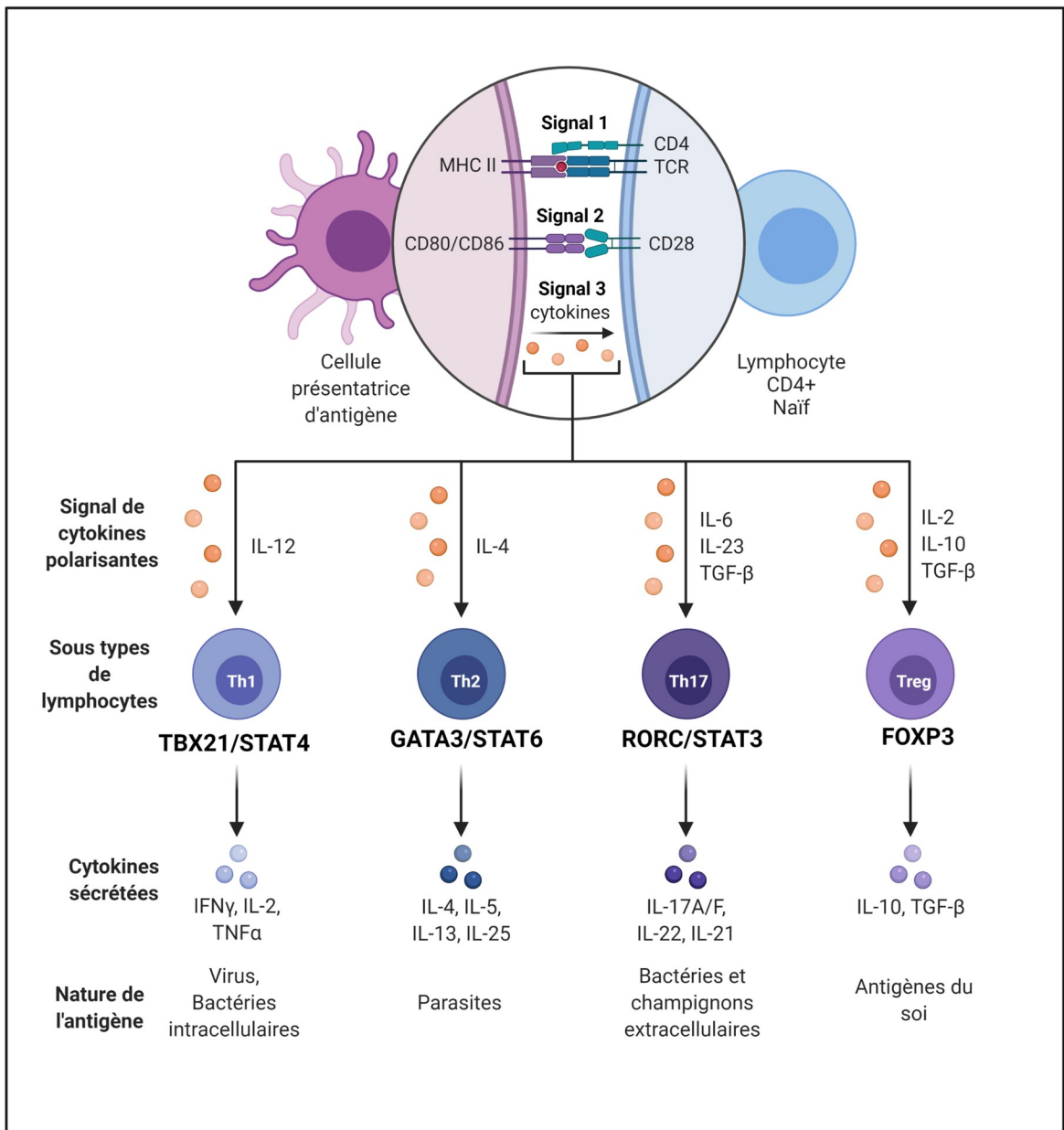
Enfin, chez l'Homme il a été démontré que la quantité de DC dans le tissu adipeux d'individus obèses est en corrélation avec la résistance à l'insuline et à l'IMC (Bertola et al., 2012). Les DC jouent donc un rôle primordial dans l'inflammation du tissu adipeux et dans ses conséquences métaboliques (Soedono and Cho, 2021).

En plus, des acteurs de l'immunité innée que sont les macrophages et les DC, les lymphocytes T jouent un rôle très important dans l'inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité (Wang and Wu, 2018). En effet, durant l'obésité, on observe une augmentation de l'infiltration du tissu adipeux par des lymphocytes helpers CD4+ (Th1, Th17) (Kintscher et al., 2008), des lymphocytes cytotoxiques CD8+ (Jiang et al., 2014; Rausch et al., 2008) ainsi qu'une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs (Treg) (Wagner et al., 2013), que ce soit chez la souris ou chez l'Homme.

### **Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques**

Les lymphocytes T CD8+ (LT) expriment le co-récepteur CD8 au niveau de leur TCR, ils sont dits cytotoxiques. En effet, les LT CD8+ sont capables d'induire la mort cellulaire via la libération de protéines cytolytiques, les perforines et les granzymes. Les perforines entraînent la formation de pores dans la membrane plasmique des cellules cibles et les granzymes utilisent ces pores afin d'induire l'apoptose. Il a été montré que les LT CD8+ sont significativement augmentés dans le tissu adipeux des sujets obèses notamment les lymphocytes T CD8+ CD11a+ (Jiang et al., 2014). De plus, leur présence a été corrélée à l'insulino-résistance et à l'inflammation du tissu (Nishimura et al., 2009). En effet, les lymphocytes T CD8+, une fois activés recrutent les macrophages in situ pour phagocyter les adipocytes nécrotiques. Avec les macrophages, les CD8+ participent à la formation des structures en couronne qui entourent les adipocytes mourants. La déplétion génique des LT CD8+ dans des souris obèses diminue considérablement le nombre de macrophages M1 et de structures en couronne dans le tissu adipeux, et est associé à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. A l'inverse, le transfert de lymphocytes T CD8+ dans des souris déficientes en lymphocytes CD8+ et nourries avec un régime hypercalorique, augmente le nombre macrophages et de structures en couronne dans le tissu adipeux (Nishimura et al., 2009).

Les LT CD8+ jouent donc un rôle essentiel dans l'initiation et le maintien de l'inflammation du tissu adipeux des sujets obèses (Kiran et al., 2021).



**Figure 13 : Schéma de la polarisation des différents sous types de lymphocytes T helper.**

### Les lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes CD4+, qui expriment le co-récepteur CD4, sont des lymphocytes dits auxiliaires (T helper). En effet, suite à la présentation d'un antigène par des cellules présentatrices, les CD4+ prolifèrent dans un premier temps, puis à travers la sécrétion de cytokines (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), ils vont activer les autres cellules immunitaires (lymphocytes T CD8+, macrophages, lymphocytes B). De fait, les CD4+ régulent la prolifération et la différenciation des CD8+ en lymphocytes cytotoxiques et celle des lymphocytes B en plasmocytes, et activent les fonctions phagocytaires des macrophages et des polynucléaires. Les lymphocytes T naïfs peuvent être polarisés en différents sous-types selon l'antigène présenté par la cellule présentatrice. En effet, un total de trois signaux sont nécessaires à leur activation, prolifération et la polarisation (de Jong et al., 2005). Le premier signal fait suite à la reconnaissance d'un peptide présenté par le CMH II d'une cellule présentatrice d'antigène via le TCR du lymphocyte T naïf. Le second signal (co-stimulation) consiste en l'interaction des molécules de co-stimulation, CD80/86 (B7.1-B7.2) avec la molécule CD28 du lymphocyte. Enfin, le dernier signal est un signal cytokinique qui va orienter la polarisation du lymphocyte T vers un des sous-types de T helper (Th1, Th2, Th17, Treg). Ainsi les Th1 sont activés par l'IL-12, les Th2 par l'IL-4, les Th17 par l'IL-6, l'IL-23 et le TGF- $\beta$  et les Tregs par l'IL-2, le TGF- $\beta$  et l'IL-10 mais ces mêmes cytokines dépendent de la nature de l'antigène capturé (**Figure 13**).

### Les lymphocytes T régulateurs

Les Treg sont des lymphocytes CD4+ qui sécrètent de l'IL-10, et/ou TGF- $\beta$ . Certaines sous-populations expriment CD25 et le facteur de transcription « Forkhead box P3 » (FoxP3). Le facteur de transcription FoxP3 permet leur différenciation en Treg (Hori et al., 2003). Les Treg peuvent avoir deux origines, les Treg naturels, générés durant la maturation thymique et les Treg induits qui découlent de la polarisation des T naïfs. De fait, les lymphocytes CD4+ naïfs peuvent être polarisés en Treg, dans ce cas, le signal cytokinique associé (3eme signal) est constitué d'IL-2 et TGF- $\beta$  mais aussi d'IL-10 (Levings et al., 2002). Les Tregs, via leurs propriétés anti-inflammatoires, sont impliqués dans l'homéostasie lymphoïde, la tolérance au soi et dans le contrôle des maladies auto-immunes. En effet, ils jouent un rôle dans l'inhibition

de l'activation des lymphocytes effecteurs Th1 et Th17 mais aussi Th2 suite à une inflammation aiguë. L'équilibre des balances Th1/Treg et Th17/Treg est importante pour une réponse immunitaire efficace et proportionnée. D'ailleurs ces deux balances sont déséquilibrées dans les maladies pro-inflammatoires chroniques/auto-immunes (M. Liang et al., 2018; Talaat et al., 2015) ainsi qu'au cours de l'obésité et du DT2 (Wang et al., 2018; Zeng et al., 2012).

En effet, chez la souris mince, les Treg sont très présents dans le TAvis, puisqu'ils représentent 40 à 50% des cellules CD4<sup>+</sup> (Feuerer et al., 2009), alors que les souris génétiquement obèses (*ob/ob*) présentent une baisse drastique des Treg. De plus, les Treg protègent contre l'insulinorésistance car une déplétion des Treg chez ces souris induit une augmentation de la concentration en insuline circulante et une augmentation d'expression des cytokines pro-inflammatoires. A l'inverse, l'induction de la prolifération des Treg chez ces même souris reverse le phénotype (Feuerer et al., 2009). De façon intéressante, une étude a démontré la corrélation négative entre le nombre de Treg et l'augmentation des macrophages M1 CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> (Deiuliis et al., 2011).

En accord avec les observations chez la souris, chez l'Homme en état d'obésité et souffrant de DT2, le nombre de Treg est diminué par rapport aux sujets minces, que ce soit dans le tissu adipeux (Deiuliis et al., 2011; Lauren E. Gyllenhammer et al., 2016) ou en périphérie (Wagner et al., 2013; Yuan et al., 2018). De plus, le nombre de Treg est corrélé négativement au poids corporel, à l'IMC et à la concentration en leptine circulante chez des sujets obèses (Wagner et al., 2013). La fréquence des Tregs est également diminuée chez les individus souffrant de DT2 et atteints d'obésité par rapport aux sujets DT2 et non obèses (Yuan et al., 2018). Le nombre de Tregs est également réduit chez les enfants atteints d'un syndrome métabolique. Enfin, les Tregs diminuent également chez les patients atteints de DT2 par rapport aux patients non diabétiques, alors que le nombre de Th1 et Th17 augmente chez ces sujets. Cela suggère un déséquilibre dans la balance Th1/Th17/Treg au cours de l'obésité.

En conclusion : la présence de Treg est bénéfique à l'homéostasie du tissu adipeux et à la résolution de l'inflammation via l'IL-10 et l'induction de macrophages M2 anti-inflammatoires. La baisse chez le sujet en état d'obésité ou en tout cas le déséquilibre Th1/Th17/Treg est au cœur de l'inflammation du TA et de ses conséquences métaboliques (Liu et al., 2021).

## Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes CD4+ naïfs peuvent être polarisés en Th2 par un signal cytokinique composé d'IL-2 et d'IL-4. Ces cytokines activent l'expression des facteurs de transcription « GATA binding protein 3 » (GATA3) et « Signal transducer and activator of transcription 6 » (STAT6) et la sécrétion par les lymphocytes Th2 de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-13 et de l'IL-25, qui ont une action anti-inflammatoire. Ces cytokines sont notamment, impliquées dans la polarisation des macrophages de type M2.

Les données sur les Th2 et l'obésité sont peu nombreuses. Néanmoins, une étude a montré que le pourcentage de Th2 dans le TAsc et TAviS humain est négativement corrélé à la résistance à l'insuline et à l'inflammation périphérique (McLaughlin et al., 2014). Cela pourrait indiquer un rôle protecteur dans l'inflammation et les dysfonctionnements métaboliques liés à l'obésité.

## Les lymphocytes Th1

Les lymphocytes naïfs peuvent être polarisés en Th1 par la présence d'IL-12 et d'IFN $\gamma$ . Ces cytokines activent l'expression des facteurs de transcription « T-box transcription factor 21 » (TBX21 ou T-bet) et « Signal transducer and activator of transcription 4 » (STAT4). L'activation de ces facteurs de transcription induit l'expression de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2, du TNF- $\alpha$  et la lymphotoxine- $\alpha$  par les Th1.

Il a été démontré une corrélation entre l'infiltration des Th1 dans le tissu adipeux viscéral au cours de l'obésité, et l'IMC (Kintscher et al., 2008). De plus, les CD4+ du tissu adipeux viscéral du sujet obèse produisent une quantité plus importante d'IFN $\gamma$  que ceux des sujets minces (Khan et al., 2014). TBX21 est requis pour l'expression par les Th1 de l'IFN $\gamma$  ainsi que de CXCR3 (un récepteur de chémokine) (Nakajima et al., 2002). TBX21 est donc en partie responsable de la migration des Th1 vers le tissu adipeux obèse. De plus, l'IFN $\gamma$  est capable d'inhiber la réponse à l'insuline, le stockage des lipides par les adipocytes, ainsi que l'adipogenèse (McGillicuddy et al., 2009).

Au sein du tissu adipeux viscéral obèse, les niveaux d'expression du CMH II et des molécules co-stimulatrices, exprimés par les macrophages et les DC augmentent. Cela a pour

effet d'augmenter l'activation et la prolifération des Th1, entraînant une augmentation de la production d'IFN $\gamma$ , responsable de l'activation des macrophages et des DC sécrétant de l'IL-12. L'IL-12 induit alors la polarisation des Th1. Une boucle d'amplification de la réponse Th1 est ainsi créée dans le tissu adipeux (de Jong et al., 2005; Deng et al., 2016; Kintscher et al., 2008; Rocha et al., 2008). Enfin, les Th1 sont également augmentés en périphérie chez les patients obèses et DT2 (Jagannathan-Bogdan et al., 2011; Zeng et al., 2012) et leur nombre dans le tissu adipeux est corrélé à la concentration de protéine C réactive, d'IL-6 et à l'insulino-résistance (McLaughlin et al., 2014).

Au final, les Th1 participent à l'inflammation et l'insulino-résistance du tissu adipeux chez le sujet en état d'obésité, notamment via la sécrétion d'IFN $\gamma$ , le recrutement et l'activation des macrophages et des DC.

## B. L'initiation de l'inflammation du tissu adipeux précède la résistance à l'insuline

### **Déclenchement de l'inflammation**

Il existe potentiellement plusieurs déclencheurs différents dont : l'excès de nutriment, une dysbiose intestinale et enfin l'expansion rapide et incontrôlée du tissu adipeux.

#### *a) L'excès de nutriment*

L'excès d'apports induit une augmentation des lipides circulants qui peuvent contribuer à l'inflammation du tissu adipeux lorsque le sujet est en situation d'obésité (du fait d'un déséquilibre en faveur de la lipolyse). Les AGNE peuvent se lier aux TLR, tels que TLR2 et TLR4 exprimés par les macrophages infiltrant le tissu adipeux (Nguyen et al., 2007). Via TLR2/4, les AGNE induisent l'activation des voies « c-Jun N-terminal kinases » (JNK) et « Nuclear factor-kappa B » (NF- $\kappa$ B) augmentant la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  ou encore le TNF- $\alpha$ . Le transporteur d'acide gras, aP2/FABP4, pourrait également favoriser la signalisation pro-inflammatoire dans les macrophages. En effet,

des macrophages déficients en aP2/FABP4 présentent une activité réduite de la kinase IKK $\beta$  entraînant une réduction de l'expression de COX-2 et des cytokines pro-inflammatoires (Makowski et al., 2005).

#### b) *Dysbiose intestinale*

L'obésité et le régime hypercalorique associé, sont responsables de l'altération du microbiote intestinal. En effet, chez l'adulte, le microbiote intestinal est principalement constitué de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes*. Au cours de l'obésité, la dysbiose intestinale est caractérisée par une augmentation de la présence de *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroidetes* (Konrad and Wueest, 2014). De plus, la diminution de la diversité bactérienne est corrélée à la résistance à l'insuline, l'inflammation et la dyslipidémie (Karlsson et al., 2013). La modification des espèces bactériennes est accompagnée d'une augmentation de la perméabilité intestinale entraînant notamment une hausse du taux circulant des lipopolysaccharides (LPS) produits par les bactéries intestinales (Cani et al., 2008). Le passage de la barrière intestinale par le LPS est facilité par une diminution de l'expression des gènes des jonctions serrées expliquant en partie l'augmentation de la perméabilité intestinale. Le LPS peut induire une cascade inflammatoire via l'activation des récepteurs « Toll Like Receptor 4 » (TLR4) (Saad et al., 2016). Le LPS dérivé de l'intestin a été démontré comme activateur de l'inflammation du tissu adipeux mésentérique (Cani et al., 2008). De plus, des taux circulants de LPS ont été retrouvés plus élevés chez des patients atteints de DT2 par rapport aux patients contrôles (Jayashree et al., 2014).

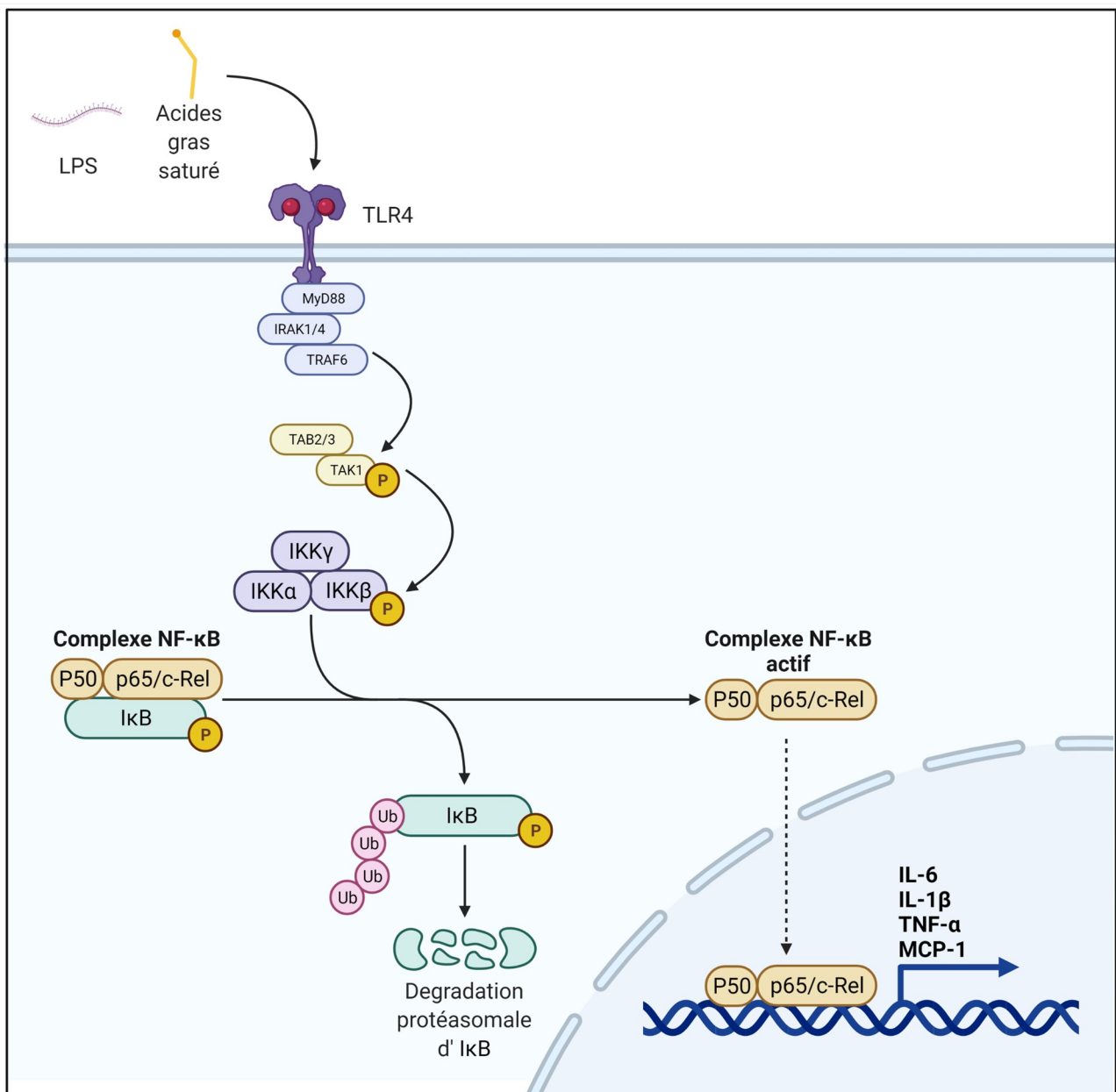
#### c) *Expansion du tissu adipeux*

L'expansion incontrôlée du tissu adipeux pourrait également être responsable de l'initiation de l'inflammation au sein de ce dernier. A l'état basal, suite à un apport conséquent d'énergie, l'expansion du tissu adipeux passe par une phase d'hyperplasie du tissu via l'adipogenèse, notamment dans le TAsc. Cette hyperplasie est accompagnée d'une angiogenèse appropriée afin d'oxygéner de façon efficace le tissu. Enfin, ce phénomène s'accompagne également d'un remodelage de la matrice extracellulaire du tissu adipeux. Or, au cours de



l'obésité, l'apport trop important d'énergie est associé à un accroissement rapide et massif du tissu adipeux. Cette expansion s'accompagne de l'hypertrophie des adipocytes et d'une angiogenèse inadaptée, notamment dans le TAVis. En effet, lorsque le TAsc ne peut plus s'expandre, le TAVis est alors la cible des acides gras. Dans ce tissu, l'adipogenèse est défectueuse mais l'hypertrophie adipocytaire est très augmentée, engendrant plus d'hypoxie, de nécrose et d'inflammation. Ceci aboutit à la mise en place de zones faiblement oxygénées dans le tissu adipeux (Sun et al., 2011). La diminution de l'apport en oxygène dans le tissu adipeux est connue pour augmenter l'expression de certains gènes comme celui de l'« Hypoxia-inductible factor-1 $\alpha$  » (HIF-1 $\alpha$ ), de la leptine, de l'IL-6, ou encore de la « Monocyte chemoattractant protein-1 » (MCP-1), ce dernier favorisant le recrutement des monocytes dans le tissu (Quintero et al., 2012). En accord, une étude a montré la présence de monocytes/macrophages au sein des zones hypoxiques du tissu adipeux de souris rendues obèses par surnutrition (Rausch et al., 2008). En effet, l'hypoxie du tissu adipeux induit la lyse des adipocytes par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et le recrutement de macrophages pour phagocyter les adipocytes apoptotiques.

A l'inverse d'une inflammation aiguë, qui après une phase d'induction et d'élimination du pathogène conduit à une phase de résolution, l'inflammation associée à l'obésité est une inflammation chronique de bas grade. Cette inflammation est notamment liée à une infiltration progressive du tissu adipeux par des cellules immunitaires pro-inflammatoires, du fait de la nécrose adipocytaire. Celles-ci à leur tour modifient le profil des adipocytes vers un profil inflammatoire (Eljaafari et al., 2015a). Ce cercle vicieux est à l'origine de l'inflammation chronique à bas bruit. Cette infiltration du tissu adipeux est associée à une sécrétion d'adipokines et de molécules pro-inflammatoires qui contribuent à une dysfonction du tissu adipeux puis à une dysfonction des organes périphériques dus à la propagation de l'inflammation de bas grade. Cette inflammation entraîne la résistance à l'insuline de ces différents tissus ou organes et conduit au DT2. De plus, l'inflammation chronique du tissu adipeux participe à la mise en place de la fibrose de ce dernier. Cette fibrose limite à son tour l'oxygénation et l'expansion du tissu favorisant encore l'hypoxie.



**Figure 14 : Schéma de l'activation de la voie TLR4 suite à la fixation d'un ligand (LPS, AGNE).**

## C. Les voies de l'inflammation

### La voie TLR4/NF- $\kappa$ B

Le récepteur TLR4 est un récepteur de l'immunité innée, exprimé principalement par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) comme les cellules dendritiques et les macrophages mais également par les adipocytes (Vitseva et al., 2008) et les CSA (Najar et al., 2017). Le récepteur TLR4 a pour ligand des endotoxines comme le LPS ou des acides gras saturés. La stimulation du TLR4 par un ligand induit le recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 suivi par celui des protéines « Interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4 » (IRAK1/4) puis du « TNF receptor-associated factor 6 » (TRAF6). TRAF6 va phosphoryler « Transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1 » (TAK1) qui va elle-même phosphoryler IKK $\beta$ . Le complexe IKK peut alors phosphoryler la sous-unité IKB $\alpha$ , inhibitrice du complexe NF- $\kappa$ B et ainsi induire sa dégradation par le protéasome (Hayden and Ghosh, 2012). NF- $\kappa$ B libéré devient actif et va pouvoir être transloqué dans le noyau afin d'exercer sa fonction de facteur de transcription. NF- $\kappa$ B est capable d'induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  mais également de chémokines comme le MCP-1, ou l'IL-18 (T. Liu et al., 2017) (**Figure 14**) et COX-2. Or la plupart de ces cytokines et chimiokines sont impliquées dans l'inflammation du tissu adipeux et l'insulinorésistance. Il est intéressant de noter que la voie NF- $\kappa$ B est également activée par l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . De plus, NF- $\kappa$ B a été retrouvé comme augmenté dans le tissu adipeux chez des souris rendues obèses par surnutrition (Carlsen et al., 2009). L'utilisation d'inhibiteurs d'IKK $\beta$  ou sa délétion chez ces mêmes souris améliore leur résistance à l'insuline et réduit la masse de leur tissu adipeux (Benzler et al., 2015). De manière intéressante, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques d'IKK $\beta$  chez des patients DT2 réduit la glycémie et l'HbA1C de ces patients (Desouza, 2010; Goldfine et al., 2010).

L'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 dont l'expression est induite par NF- $\kappa$ B sont synthétisés sous forme de pré-protéine mais nécessite une étape de clivage pour aboutir à leur forme active par l'inflammasome. Celui-ci est impliqué dans l'inflammation du tissu adipeux et joue un rôle dans cette maturation.

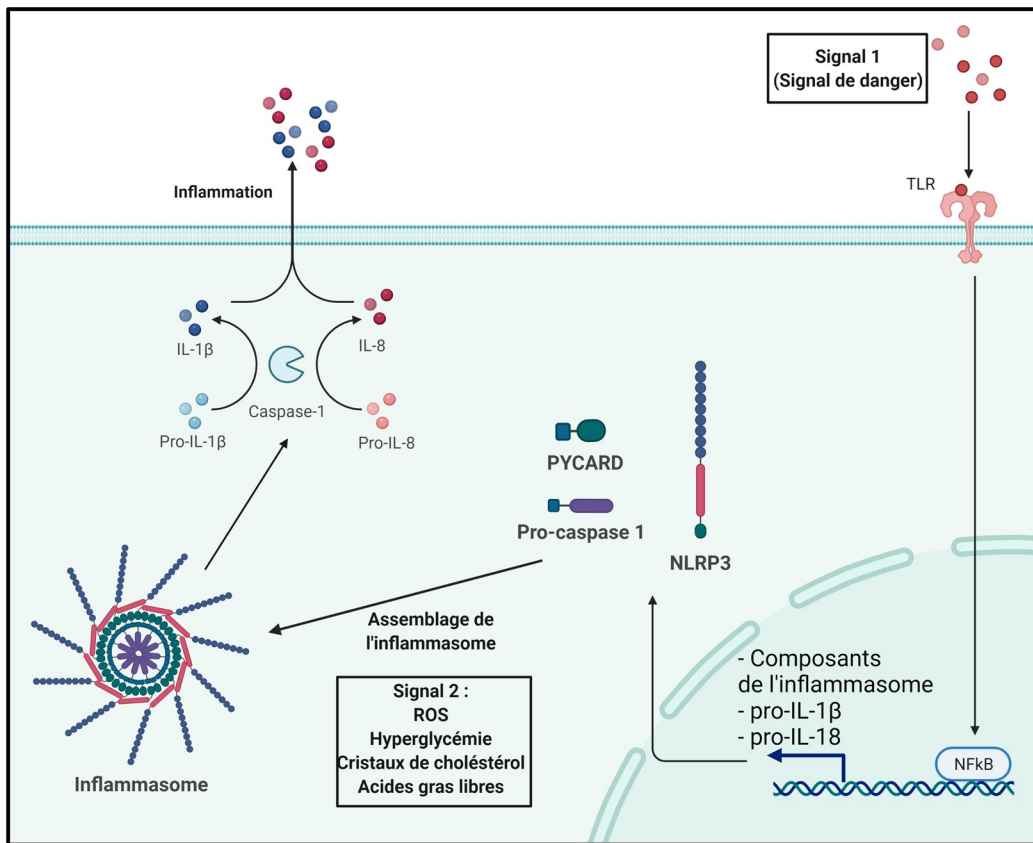


Figure 15 : Schéma de l'activation de la voie l'inflammasome NLRP3.

## L'inflammasome

L'inflammasome est un complexe protéique oligomérique cytosolique. Pour être correct, il faut parler des inflammasomes. En effet, il en existe 4 nommés NLRP1, NLRP3, NLRC4 et AIM-2. Le mieux caractérisé dans l'insulino-résistance est l'inflammasome 3, « Nod-like receptor protein 3 » (NLRP-3). Il est constitué de trois sous-unités : le senseur de signaux de danger (NLRP3), la procaspase-1 et PYCARD (ou ASC). Grâce à son activité caspase, NLRP-3 est capable de cliver la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 qui sont les formes immatures de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (B.-Z. Shao et al., 2015) (**Figure 15**).

L'activation de l'inflammasome nécessite deux étapes (Sutterwala et al., 2014). La première nécessite un signal de « priming » ou d'initiation ou signal 1, dans laquelle des signaux de dangers sont reconnus par un TLR et activent la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B induit une augmentation d'expression des composants de l'inflammasome, tel que NLRP3, en plus des pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 (Bauernfeind et al., 2009). Une autre protéine a été démontrée comme impliquée dans le « priming » de l'inflammasome NLRP3 notamment dans le tissu adipeux, il s'agit de « Regulated in development and DNA damage response-1 » (REDD1). En effet, la délétion de REDD1 inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans des macrophages mais également au niveau d'explants de tissu adipeux stimulés par le LPS. De plus, il a été montré que l'effet de REDD1 sur l'activation de l'inflammasome passe par la régulation de la voie NF- $\kappa$ B puisque son activité est inhibée dans des macrophages déficients en REDD1 (Pastor et al., 2017).

La seconde étape est l'oligomérisation de NLRP3 au cours de laquelle l'adaptateur PYCARD et la pro-caspase 1 sont recrutés formant ainsi un inflammasome actif. Ce qui déclenche la transformation de la pro-caspase-1 en caspase-1 et donc la maturation de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (B.-Z. Shao et al., 2015). Plusieurs signaux différents peuvent être responsables du déclenchement de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Ceci peut être : un autre signal de danger dont les récepteurs sont intracellulaires (NLR ou récepteur de lectin, CLR) induit par des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Crane et al., 2014), ou un flux calcique provenant de la mitochondrie (Iyer et al., 2013) ou des cristaux de cholestérol (Rajamäki et al., 2010), ou le glucose (Y. Chen et al., 2016), ou l'« High mobility group box 1 protein » (HMGB1) ou encore des « Advanced glycation end-product » (AGE) ou enfin des molécules inflammatoires comme les HSP. De plus, il a été démontré que les AGNE saturés (comme le palmitate) sont capables



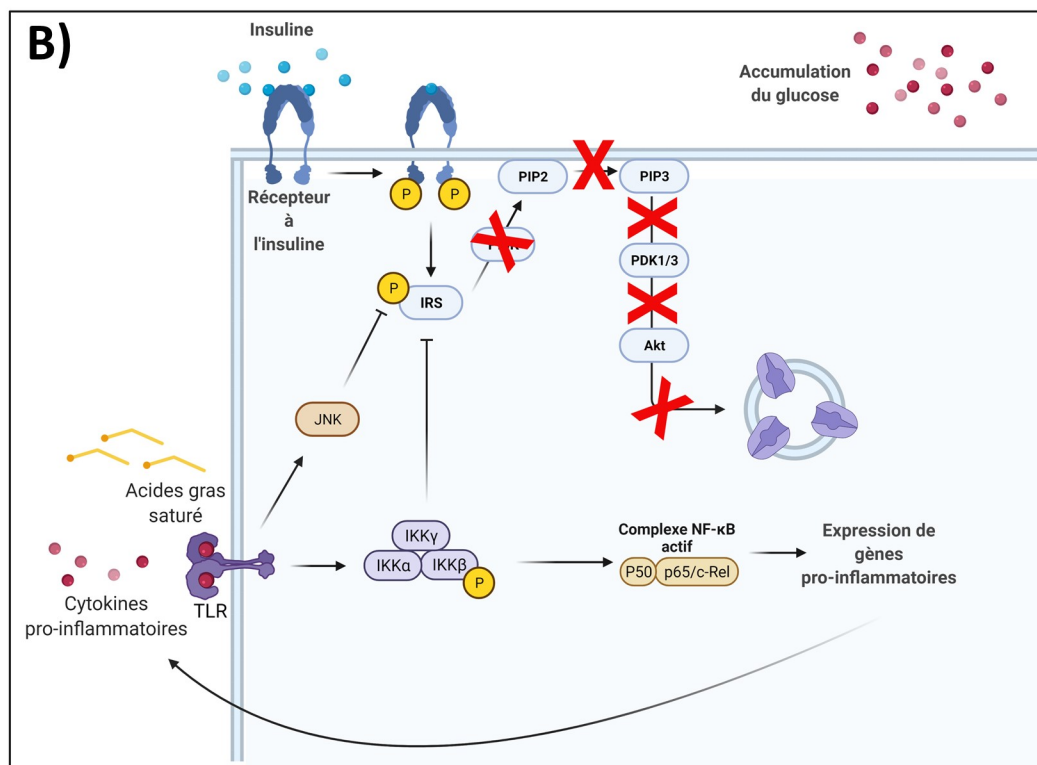
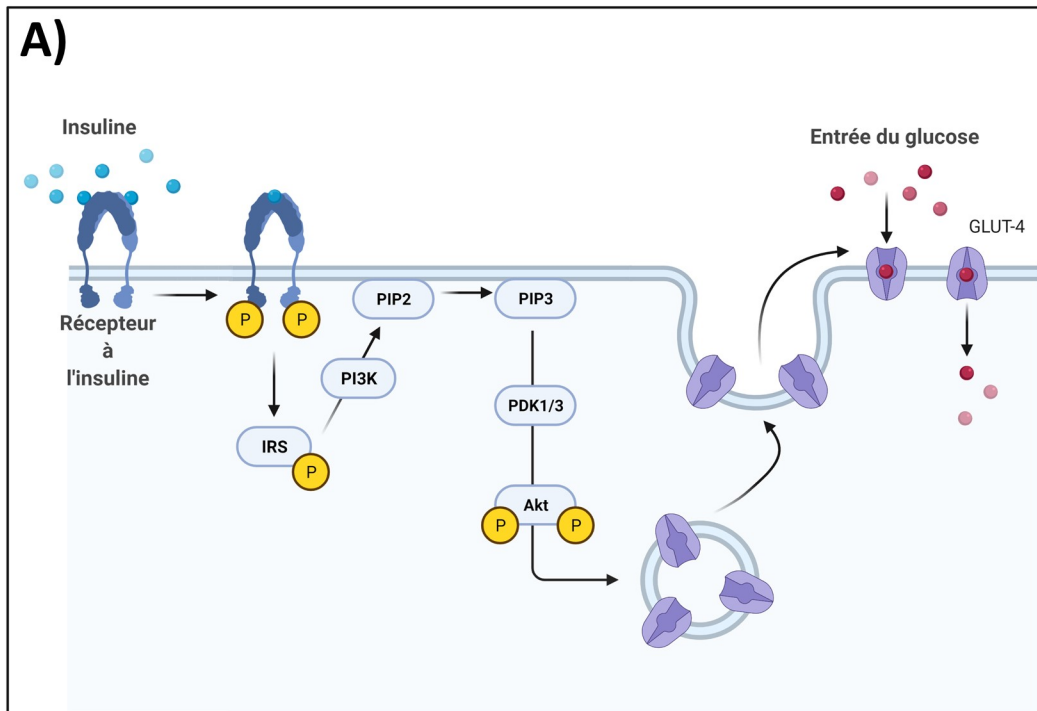
d'activer l'inflammasome dans des macrophages activés par le LPS (Wen et al., 2011) en plus de leur capacité à se lier aux TLR.

L'obésité est également connue pour augmenter les niveaux d'expression dans le tissu adipeux humain, de NLRP3 ainsi que de la procaspase-1 (Rheinheimer et al., 2017; Stienstra et al., 2010). A l'inverse, un régime amaigrissant d'au moins 1 an est capable d'induire l'inhibition de l'expression de NLRP3, de la procaspase-1 et de PYCARD dans le tissu adipeux humain (Vandanmagsar et al., 2011). De plus, la délétion de NLRP3 dans des souris soumises à un régime hypercalorique améliore la réponse à l'insuline et la tolérance au glucose de ces souris, en comparaison aux souris sauvages (Vandanmagsar et al., 2011). De plus, cette même délétion protège également les cellules  $\beta$  du pancréas de la mort causée par un régime hypercalorique (Youm et al., 2011). Enfin, il a été démontré que la délétion de REDD1, qui est également impliquée dans l'activation de NLRP3, protège de la stéatose hépatique non-alcoolique dans un modèle de souris rendues obèses par surnutrition (Dumas et al., 2020). Cela démontre donc l'impact de l'inflammasome sur l'insulino-résistance du tissu adipeux mais également des autres organes périphériques.

De façon intéressante il a été démontré que NLRP3, la procaspase-1 et PYCARD sont exprimés dans les macrophages mais également dans les adipocytes (Stienstra et al., 2010; Zhang et al., 2018). Ceci a démontré le rôle majeur de l'inflammasome NLRP3 dans l'inflammation du tissu adipeux dans son ensemble. De plus, bien que n'ayant pas déterminé quel inflammasome était activé, l'étude du Dr Eljaafari réalisée *in vitro* dans un modèle de co-culture avec des CSA provenant de sujets présentant une obésité et des cellules immunes, a clairement montré que l'activation des Th17 médiée par les CSA obèses requiert l'activation de la caspase 1 par l'inflammasome (Eljaafari et al., 2015a).

#### D. La mise en place de la résistance à l'insuline au sein du tissu adipeux

Le tissu adipeux est une des cibles de l'insuline. Cette hormone stimule le stockage des TG dans les adipocytes. En effet, l'insuline induit une augmentation de l'adipogenèse et de la lipogenèse et inhibe la lipolyse (Baumgard et al., 2016). La signalisation de l'insuline est déclenchée par la fixation de cette dernière sur son récepteur transmembranaire, qui est une



**Figure 16 : Voie de signalisation de la réponse à l'insuline chez le sujet insulinosensible (A) et insulino-résistant (B).**

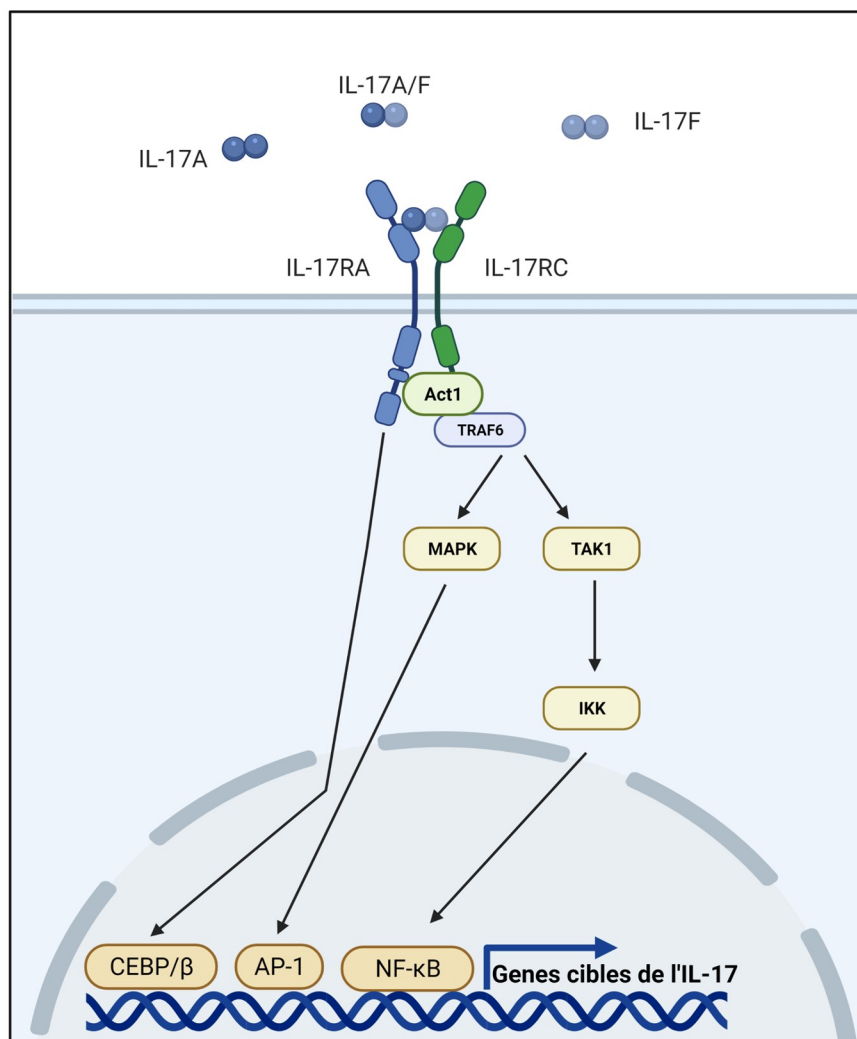
tyrosine kinase composée d'une chaîne  $\alpha$  et  $\beta$  (Lee and Pilch, 1994). La liaison de l'insuline sur son récepteur induit une autophosphorylation de ce dernier, le recrutement de protéines adaptatrices ainsi que le recrutement de l'«insulin receptor substrate 1» (IRS-1). Ce recrutement permet la phosphorylation de IRS-1 par l'activité tyrosine kinase du récepteur. (Copps and White, 2012). L'activation de IRS-1 suite à sa phosphorylation sur un résidu tyrosine, permet l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) produisant alors du phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3). Le PIP3 active à son tour d'autres kinases telles qu'Akt qui facilitent l'entrée du glucose par translocation de GLUT4 à la membrane. Si IRS-1 est phosphorylée sur certains sites, comme la sérine 307 et non pas sur un résidu tyrosine, son activité est inhibée (Aguirre et al., 2002). Ceci aura pour conséquence une diminution de l'entrée de glucose et une augmentation de la lipolyse, favorisant ainsi l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie. Suite à leur activation, la sérine/thréonine kinase IKK $\beta$ , ainsi que JNK sont capables de phosphoryler IRS-1 sur la sérine 307 et ainsi d'inhiber la signalisation de l'insuline (**Figure 16**). Or, ces deux dernières kinases, peuvent être activées par les AGNE saturés se liant au TLR2/4 ou encore par certaines cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6) (Aguirre et al., 2002; Major and Wolf, 2001; Reinhard et al., 1997). L'augmentation des cytokines inflammatoires et des AGNE saturés au cours de l'obésité induit donc le phénomène d'insulino-résistance. Cette insulino-résistance participe au défaut de stockage des lipides dans les adipocytes, qui seront alors relargués dans la circulation pour former des dépôts ectopiques, notamment au niveau musculaire, hépatique et pancréatique. Ces dépôts ectopiques associés à l'inflammation périphérique vont induire une insulino-résistance du muscle, du foie (Snel et al., 2012) ainsi qu'une inhibition de la sécrétion d'insuline par le pancréas (Saisho, 2016).

## IV. Les lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th17 sont un sous-type de T helper, bien distincts des Th1 et Th2 et ayant un rôle dans la défense microbienne et dans l'auto-immunité.

### A. Définition et caractéristiques

Les lymphocytes T naïfs peuvent être polarisés en lymphocytes Th17. Les Th17 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17A/F, l'IL-21 et l'IL-22. Les Th17 ont été découverts ils y a quelques années, en 2003 (Aggarwal et al., 2003), mais l'IL-17 a été clonée depuis 1995 (Yao et al., 1995). La polarisation des lymphocytes T naïfs en Th17 est plus



**Figure 17 :Schéma simplifié de la voie de signalisation d'IL-17A/F.**

complexe que pour les autres sous-types de lymphocytes T helper. Les premières études menées chez la souris ont suggéré que l'IL-23 induit l'expression d'IL-17 (Harrington et al., 2005; Langrish et al., 2005). Cependant, des études ultérieures ont démontré que le récepteur IL-23 n'est exprimé sur les cellules Th17 qu'après polarisation, donc l'IL-23, ne peut pas induire la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th17. Pour permettre la polarisation des Th17, un signal composé d'IL-6 et de TGF- $\beta$  est nécessaire (Torchinsky and Blander, 2010). L'IL-6 induit l'expression dans les lymphocytes T naïfs de STAT3, un facteur de transcription, qui va induire l'expression d'IL-21. L'IL-21 associée à l'IL-6 et au TGF- $\beta$  renforce l'expression de STAT3. STAT3 induit l'expression d'un autre facteur de transcription, « RAR-related orphan receptor gamma » (RORC). RORC est le facteur de transcription critique pour les Th17 puisqu'il induit l'expression d'IL17 par ces derniers. En parallèle de cette signalisation, l'IL-6 et l'IL-21 induisent l'expression du récepteur à l'IL-23, IL-23R. Ce récepteur est exprimé sur les lymphocytes Th17 activés ou mémoires. La fixation de l'IL-23 sur son récepteur permet la stabilisation de l'expression de STAT3 et de RORC et permet le maintien du phénotype Th17 (Torchinsky and Blander, 2010).

L'IL-17 appartient à une famille composée de 6 cytokines structurellement apparentées : l'IL-17A à l'IL-17F. L'IL-17A et F sont impliquées dans l'inflammation, elles partagent d'ailleurs plus de 50 % d'homologie (McGeachy et al., 2019; Starnes et al., 2001). Il existe cinq récepteurs pour l'IL-17 : IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD et IL-17RE (Gaffen, 2009), les récepteurs de l'IL-17 se dimérisent afin de pouvoir fixer leurs ligands. Le récepteur pour l'IL-17A et F est composé de la sous-unité IL-17RA et RC (S. Liu et al., 2013). Ce dimère est exprimé de façon ubiquitaire avec un taux d'expression particulièrement augmenté dans les cellules de la lignée hématopoïétique (Gaffen, 2009).

La fixation de l'IL-17A ou F à son récepteur induit le recrutement d'Act1. Act1 a une activité E3 ubiquitine ligase. Lors de son recrutement au niveau du récepteur, il recrute et ubiquitine TRAF6. Ainsi comme dans la voie TLR4, TRAF6 phosphoryle TAK1 et induit son activation. TAK1 pourra alors activer la voie NF-KB. En parallèle, TRAF6 permet l'activation des voies MAPK (mitogen-activated protein kinase) et AP1 (Protéine activatrice 1) et des facteurs de transcription C/EBP $\beta$  (McGeachy et al., 2019) (**Figure 17**). L'activation de ces différentes voies de signalisation permet l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), de chimiokines (CXCL8, CXCL1, CXCL10) et de métalloprotéinases matricielles. Or l'expression des récepteurs de, l'IL-17A/F est ubiquitaire, assurant donc un rôle inflammatoire important de ces cytokines car capables de propager l'inflammation.

## B. Rôle durant l'immunité

Le rôle des Th17 dans l'immunité est particulièrement important au niveau des surfaces épithéliales et des muqueuses (Ouyang et al., 2008). L'infection par des bactéries extracellulaires gram positives comme *Propionibacterium acnes*, gram négatives telles que *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, ou encore par des champignons comme *Candida albicans*, est capable d'activer la réponse Th17 (Miossec et al., 2009). L'IL-17 participe notamment au recrutement des polynucléaires neutrophiles (Liu et al., 2016). Par exemple, la bactérie *Klebsiella pneumoniae* induit la sécrétion d'IL-17 par les Th17 intra pulmonaires. Cette sécrétion est capable d'induire l'expression d'IL-1 $\beta$ , d'IL-8 et de la protéine inflammatoire des macrophages-2 (MIP-2) et du facteur de stimulation des colonies de granulocytes (GM-CSF) par les cellules pulmonaires. Ces facteurs permettent un recrutement accru des polynucléaires neutrophiles (Ye et al., 2001). Dans le cas d'une infection fongique, l'IL-17 et les Th17 participent également, à la protection de l'organisme. *Candida albicans* est un organisme commensal qui colonise les muqueuses humaines. Les souris IL-17RA<sup>-/-</sup> sont très sensibles à l'infection par *Candida albicans*. Chez ces souris, une forte diminution du nombre de neutrophiles a été mise en évidence (W. Huang et al., 2004). D'ailleurs, une autre étude a montré dans un modèle murin de candidose, que l'IL-17 et l'IL-23 jouent un rôle protecteur contre *Candida albicans* (Conti et al., 2009). En dehors de leur rôle dans l'immunité antibactérienne, un sous-type des lymphocytes Th17 dit « pathogénique » est impliqué dans la physiopathologie des maladies auto-immunes/inflammatoires (Chehimi et al., 2017).

En effet, les lymphocytes Th17 ne sont pas une population homogène. Il faut séparer les Th17 non pathogéniques, associés à la résolution des infections bactériennes et fongiques, et les Th17 pathogéniques associés à l'inflammation chronique et aux maladies auto-immunes. Les Th17 non pathogéniques et pathogéniques diffèrent notamment par leur localisation. Les Th17 non-pathogéniques se retrouvent au niveau des muqueuses alors que les Th17 pathogéniques se trouvent dans les sites d'inflammation chronique. Des lymphocytes Th17 ont été identifiés dans plusieurs pathologies inflammatoires chroniques ou auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, la sclérose en plaques et la maladie inflammatoire de l'intestin, dans ces maladies une augmentation du nombre de Th17 a par conséquent été mise en évidence (Eljaafari et al., 2012; Li et al., 2017; Restorick et al., 2017; Rovedatti et al., 2009; Weaver et al., 2013). De façon intéressante, chez des patients diabétiques de type I, il existe une corrélation entre le pourcentage de cellules Th17 pathogéniques dans le sang et la gravité

de la pathologie (Reinert-Hartwall et al., 2015), suggérant que cette population de lymphocytes T pourrait jouer un rôle important dans les maladies auto-immunes pro-inflammatoires.

La polarisation des lymphocytes T naïfs en cellules Th17 non pathogéniques ou pathogéniques dépend du milieu cytokinique présent au cours du processus de différenciation. Le traitement de lymphocytes T naïfs par l'IL-6 et le TGF- $\beta$ 1 favorise la polarisation en Th17 non pathogéniques (McGeachy et al., 2007). Les Th17 non pathogéniques sécrètent de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui limite leur pathogénicité. Cependant, l'exposition de Th17 non pathogéniques à l'IL-23, pourrait entraîner leur conversion en cellules Th17 pathogéniques (Ghoreschi et al., 2010). De plus, la polarisation des Th17 pathogéniques pourrait se faire en absence de TGF- $\beta$ 1, en présence d'un cocktail de cytokines composé soit d'IL-6, d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$  (Ghoreschi et al., 2010). Le TGF- $\beta$ 3 pourrait également avoir un rôle dans la polarisation des Th17 pathogéniques. En effet, en combinaison avec l'IL-6, il permet d'induire un phénotype pathogénique. Les auteurs ont proposé un modèle dans lequel le type de TGF- $\beta$  (1 ou 3) serait au cœur de la détermination vers l'un des deux phénotypes durant la première étape de polarisation des Th17 (Lee et al., 2012). Le GM-CSF, la prostaglandine E2 ou encore la molécule RBPJk, qui est associée à la régulation de la voie Notch, sont associés à la pathogénicité des Th17 (Boniface et al., 2009; El-Behi et al., 2011; Meyer Zu Horste et al., 2016). En différenciant les Th17 pathogéniques et non-pathogéniques *in vitro*, près de 233 gènes ont été décrits comme régulés de façon différentielle entre les deux sous-types de Th17. Les lymphocytes Th17 pathogéniques expriment plus de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires telles que CXCL3, CCL4, CCL5, l'IL-3 et IFN $\gamma$  et des facteurs de transcription tels que TBX21 et STAT4, tandis que les cellules Th17 non pathogéniques sécrètent des cytokines anti-inflammatoires, telle que l'IL-10 (Lee et al., 2012; Xinyu Wu et al., 2018). TBX21 et STAT4 sont les facteurs de transcription spécifiques des Th1. Les Th17 pathogéniques ont donc un profil de Th17/Th1 ce qui se traduit par l'expression d'IL-17 d'une part et d'IFN $\gamma$  d'autre part.

## C. Les Th17 au cours de l'obésité

Une augmentation du nombre de Th17 et de la production d'IL-17A/F ont été décrites dans le tissu adipeux, le foie et le sang de souris soumises à un régime hypercalorique (Chen et al., 2014; Winer et al., 2009; Zúñiga et al., 2010). Les mêmes observations ont été obtenues chez l'Homme. En effet, chez les sujets obèses et/ou DT2, le nombre de Th17 ainsi que la sécrétion d'IL-17 a également été décrite comme augmentée, notamment dans le tissu adipeux (Dalmas et al., 2014; Fabbrini et al., 2013) mais également en périphérie (H. Chen et al., 2016; Ip et al., 2016). Les lymphocytes Th17 sont également augmentés en périphérie chez les enfants atteints d'obésité abdominale ou de diabète de type I (Łuczyński et al., 2015). De plus, l'expression des récepteurs de l'IL-17 dans le muscle et le foie est corrélée à l'insulino-résistance (Fabbrini et al., 2013).

A l'inverse, une autre étude a mis en évidence une diminution du niveau circulant d'IL-17 chez des patients atteints de DT2 (Cortez-Espinosa et al., 2015). Néanmoins, tous les volontaires dans cette étude étaient sous metformine pour leur DT2. Il a été démontré que la metformine diminue la polarisation des Th17 chez la souris (Kang et al., 2013). De plus, chez les patients DT2 nouvellement diagnostiqués, trois mois de traitement à la metformine aboutit à une diminution de la concentration d'IL-17 (Kang et al., 2013). Ce qui laisse supposer que la diminution d'IL-17 observée dans l'étude de Cortez-Espinosa, est due au traitement de ces patients.

Au-delà de l'augmentation des Th17, dans l'obésité et ses pathologies associées, il faut également souligner le rôle de la balance entre les différents sous-types de lymphocytes T helpers. En effet, les Tregs inhibent la polarisation des Th1 et des Th17. Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment au cours de l'obésité le nombre de Tregs diminue pendant que le nombre de Th1/Th17 augmente. Il y a donc un profond déséquilibre entre ces populations. L'équilibre lymphocytaire Treg/Th17 semble être impliqué dans l'homéostasie glucidique et le contrôle de la pression artérielle (Calcaterra et al., 2020; Wen et al., 2021).

### Facteurs impliqués dans la polarisation des Th17 durant l'obésité

Plusieurs facteurs peuvent être responsable de la polarisation des Th17 durant l'obésité et ses pathologies associées.

Les macrophages M1 qui infiltrent le tissu adipeux au cours de l'obésité, peuvent participer à la polarisation et au recrutement des Th17. Ces macrophages, durant l'obésité sécrètent de l'IL-6, de l'IL-1 $\beta$ , et de l'IL-23 et comme nous l'avons vu précédemment, ces trois cytokines ont été décrites comme impliquées dans la polarisation des Th17. De plus l'expression de ces trois cytokines est corrélée à l'expansion du tissu adipeux chez le sujet obèse et/ou DT2. Aussi, au sein du tissu adipeux de patients obèses, on observe une augmentation de ces deux populations cellulaires de manière concomitante (Winer et al., 2009). Les macrophages induisent la polarisation des lymphocytes T naïfs en Th17, qui via leur sécrétion de GM-CSF vont participer à la polarisation des macrophages. Une telle boucle d'amplification a été mise en évidence *in vitro* dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde (Li et al., 2013). De plus, l'utilisation d'anticorps bloquant l'IL-1 $\beta$  dans un modèle de co-culture impliquant des lymphocytes T et des macrophages a confirmé le rôle de l'IL-1 $\beta$  provenant des macrophages dans la sécrétion d'IL-17. Dans cette étude les auteurs ont démontré que l'IL-1 $\beta$  provenant des macrophages du TAVis induit la polarisation de plusieurs populations de lymphocytes exprimant l'IL-17, l'IL-22 ou ces deux cytokines (Dalmas et al., 2014). De plus, au sein du tissu adipeux provenant de sujets obèses, le TNF- $\alpha$  est fortement exprimé (Maury and Brichard, 2010) et il a été démontré qu'il favorise la polarisation des Th1 et des Th17 (Iwamoto et al., 2007). Il a été démontré que l'acétylcoenzyme A carboxylase 1 (ACC1), une enzyme qui limite la vitesse de synthèse des acides gras, est positivement régulée durant l'obésité. L'augmentation d'ACC1 permet une augmentation de la polarisation des Th17 et ce, en favorisant la liaison du facteur de transcription ROR $\gamma$ t (le gène orthologue de RORC chez la souris) au niveau du promoteur des gènes spécifiques des Th17 (Endo et al., 2015).

D'autres molécules peuvent participer à la régulation des Th17. Par exemple, l'irisine, une hormone récemment identifiée, a été décrite comme protectrice contre la prise de poids associée à un régime hypercalorique (Boström et al., 2014). Il a par la suite été démontré que la concentration d'irisine était inversement corrélée aux complications liées au DT2, tel que les rétinopathies et qu'elle avait un effet protecteur vis-à-vis de ces pathologies (Hu et al., 2016). Wang et son équipe ont suggéré que cette protection était liée à une inhibition de la sécrétion d'IL-17 (Wang et al., 2016). La molécule de costimulation OX40 (CD134) semblerait par contre, jouer un rôle dans la polarisation des Th17. En effet, la délétion de cette molécule chez des souris rendues obèses diminue leur prise de poids, ainsi que leur glycémie à jeun. De plus, la déplétion de OX40 induit une diminution partielle du nombre de Th17 dans le tissu adipeux (B. Liu et al., 2017).

Enfin, les CSA du sujet obèse sont également capables d'induire la polarisation des lymphocytes T en Th17 (Eljaafari et al., 2015a). Nous verrons plus en détail l'implication des CSA dans le chapitre suivant. Notre équipe a également mis en évidence le rôle des adipocytes provenant de sujets en état d'obésité, dans la polarisation des Th17 (Chehimi et al., 2017).

## V. Propriétés des cellules souches du tissu adipeux : issues de sujets minces ou obèses

Le tissu adipeux au cours de l'obésité voit le profil des cellules qui l'infiltrent, se modifier. Comme nous l'avons vu, les cellules immunitaires anti-inflammatoires disparaissent au profit des cellules pro-inflammatoires. Les CSA provenant de sujets normo-pondérés possèdent des capacités d'immunosuppression, au même titre que les CSM de la moelle osseuse (Waldner et al., 2018). Un article a démontré que les propriétés d'immunosuppression des CSA seraient supérieures à celles des CSM isolées de la moelle osseuse (Melief et al., 2013b). Néanmoins, durant l'obésité les propriétés des CSA évoluent vers un profil inflammatoire.

### A. Généralités sur les cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées qui possèdent des capacités d'auto-renouvellement, de différenciation selon les stimuli et de prolifération en culture. Les cellules souches peuvent être classées en fonction de leur potentiel de différenciation ainsi que par leur origine. On distingue 4 grands types de cellules souches :

- Les **cellules souches totipotentes** qui sont retrouvées au sein du zygote, jusqu'au stade morula (8 cellules). Elles sont dites totipotentes car elles peuvent se différencier en tous les types cellulaires y compris les annexes embryonnaires. Elles peuvent donc permettre le développement d'un organisme entier (Kelly, 1977).
- Les **cellules souches pluripotentes** correspondent aux cellules souches embryonnaires. Elles sont présentes dans la masse interne du blastocyte. Elles peuvent se différencier en tous les types cellulaires des trois feuillets embryonnaires (Thomson et al., 1998). Parmi les cellules souches pluripotentes se trouvent

également les cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Les iPSC sont issues de cellules adultes différenciées qui sont reprogrammées afin de retrouver des caractéristiques de cellules pluripotentes (Takahashi and Yamanaka, 2006).

- Les **cellules souches multipotentes** sont retrouvées dans les tissus fœtaux et adultes, et possèdent des capacités d'auto-renouvellement. Elles peuvent donner naissance à plusieurs types cellulaires mais sont déjà engagées. Les CSM tout comme les CSA sont des cellules souches multipotentes (Pittenger et al., 1999).
- Les **cellules souches unipotentes** sont capables de se différencier en un seul type cellulaire mais possèdent encore leur capacité d'auto-renouvellement (Zakrzewski et al., 2019).

## B. Les CSA provenant du tissu adipeux des sujets minces : caractéristiques et capacités d'immunomodulation

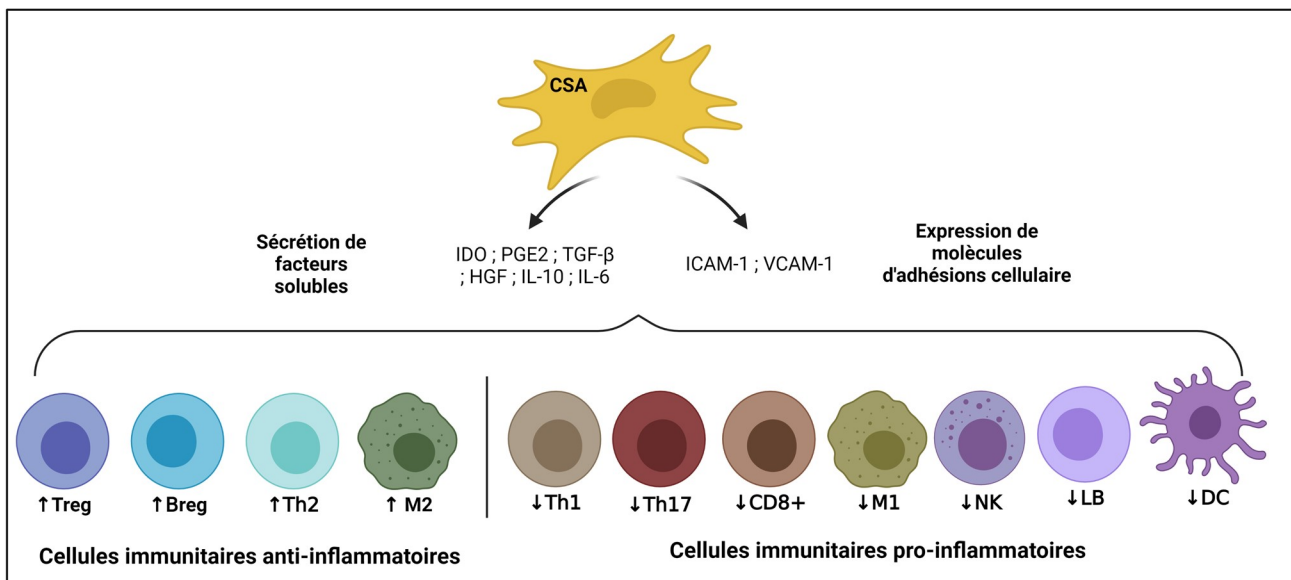
### Caractéristiques et localisations des CSA

Ainsi les CSA sont des CSM adultes présentes au sein du tissu adipeux. La première description des CSM fut réalisée par le pathologiste allemand Julius Cohnheim en 1867. A l'époque d'après Prockop, Cohnheim avait observé et décrit des cellules fibroblastiques provenant de la moelle osseuse et capables de réparer un tissu lésé (Prockop, 1997). Plus tard, en cultivant des cellules de moelle osseuse issues de cobayes, Friedenstein et ses collègues ont trouvé une population de cellules non hématopoïétiques ayant une morphologie fibroblastique nourricière et pouvant adhérer au plastique des flacons de culture. Ces cellules étaient capables de former des colonies, dont la taille augmentait progressivement. Ces colonies ont été nommés « colony-forming unit fibroblasts » (CFU-F). Le CFU-F consiste en un clone de cellules individuelles, chaque colonie étant formée par des cellules identiques. Ces cellules ont une activité proliférative élevée et sont capables de se différencier en d'autres types cellulaires (Friedenstein et al., 1970). Les CSM sont des cellules capables d'auto-renouvellement dites multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier *a minima* en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes. Il n'y a pas de marqueur spécifique pour l'identification des CSM. Néanmoins, en 2006, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire a proposé des critères minimaux pour identifier les CSM. Les CSM doivent être adhérentes au plastique et doivent exprimer trois clusters de différenciation (CD) CD73, CD90 et CD105. Cependant, elles ne



doivent pas exprimer CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alpha, CD19 et l'antigène leucocytaire humain-DR (HLA-DR). Enfin, les CSM doivent avoir un potentiel de différenciation in vitro, adipogénique, ostéogénique et chondrogénique (Dominici et al., 2006). C'est plus de 30 ans après Friedenstein que les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux ont été décrites (Zuk et al., 2001). Les CSA sont obtenues après une liposuction ou une chirurgie bariatrique, suivi d'une digestion enzymatique du tissu et d'une centrifugation, on obtient alors la SVF qui contient les CSA, entre autres. Les CSA possèdent les mêmes caractéristiques minimales que les CSM, grâce à leur adhérence au plastique et leur prolifération élevée, il est relativement simple de les isoler des autres cellules présentes dans la SVF. Une différence avec les CSM est liée à l'expression de CD34, qui peut être présent très précocement après leur isolement mais qui disparaît rapidement en culture (Maumus et al., 2008; Silva et al., 2017). De plus, les CSA ont pour avantage d'être bien plus nombreuses que les CSM de la moelle osseuse.

Les CSA sont localisées dans un environnement particulier au sein du tissu adipeux, la niche. Le terme niche a été utilisé pour la première fois par Schofield en 1978 (Schofield, 1978). La niche est un environnement complexe et dynamique avec des interactions continues entre les cellules souches et les cellules de la niche, permettant aux cellules souches de rester dans un état de quiescence et de maintenir leurs propriétés d'auto-renouvellement. La niche fournit également une barrière face au stress que peut subir le tissu. Néanmoins, l'atteinte de la niche pourrait être l'une des causes de certaines pathologies, en modifiant les propriétés intrinsèques des cellules. Un exemple de niche est celle de la niche périvasculaire dans laquelle les CSA sont associées aux cellules périvasculaires entourant les vaisseaux sanguins du tissu adipeux (Pérez et al., 2018). Leur localisation leur permet de participer à l'angiogenèse et à l'adipogenèse du tissu. Le facteur majeur de la niche qui module la quiescence et stimule les CSA est le « fibroblast growth factor 2 » (FGF2). Il joue un rôle dans l'auto-renouvellement des CSA (Zaragosi et al., 2006) et maintient leur multipotence (Rider et al., 2008). Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) stimule la prolifération et la migration des CSA (Kang et al., 2005). Réciproquement les CSA sécrètent du VEGF $\alpha$  permettant le développement de l'angiogenèse.



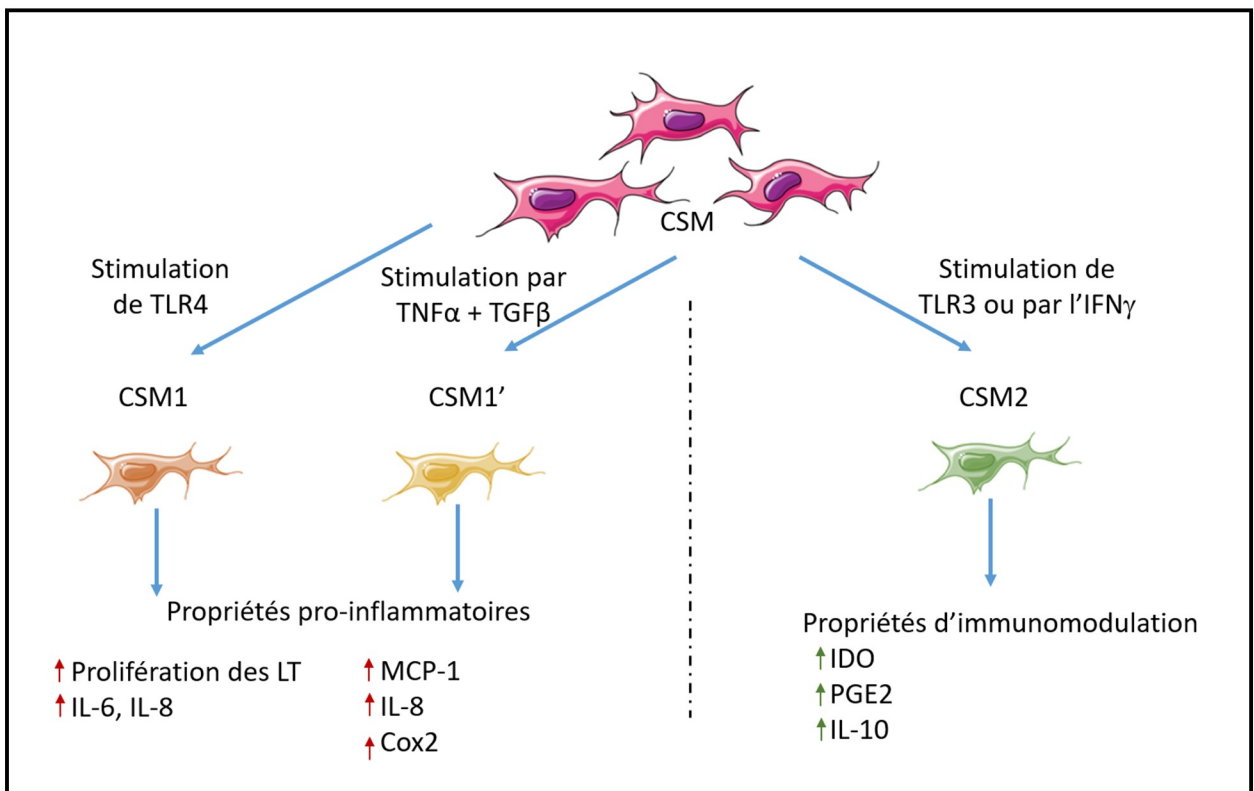
**Figure 18 : Résumé des propriétés immunomodulatrice des CSA.**

### Propriétés immunomodulatrices des CSA

Les CSA sont considérées comme ayant des propriétés d'immunomodulation plus importantes que les CSM. En comparaison avec les CSM, elles ont pour avantage d'être accessibles plus facilement, d'où leur utilisation en thérapie cellulaire. Par exemple, l'injection de CSA à des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde limite l'inflammation en induisant la sécrétion d'IL-10 et la polarisation des Tregs (Lopez-Santalla et al., 2015). De plus, les CSA sont tolérogènes puisqu'elles n'expriment que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et non pas de classe II (CMH II), ce qui limite le risque de rejet. Deux modes d'action permettent aux CSA de médier leur activité immunosuppressive : soit par contact cellulaire, soit par sécrétion de facteurs solubles (**Figure 18**).

Néanmoins, à l'état basal, les CSA sont peu immunosuppressives. Cette fonction nécessite une étape de « priming » afin d'induire leur activité d'immunomodulation. Aussi, l'IFN $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-17A ou encore l'IL-1 $\beta$  sont capables d'induire les fonctions immunosuppressives des CSM ou CSA (Noronha NC et al., 2019; Sivanathan et al., 2015; Wobma et al., 2018). De plus, l'application de ces cytokines sur des CSA induit l'expression du CMH II par ces dernières, leur permettant de présenter des antigènes aux lymphocytes T (Crop et al., 2010). Les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 jouent également un rôle important dans l'activité immunomodulatrice des CSA, en favorisant l'interaction avec les cellules immunitaires. Pour rappel, les lymphocytes T CD8 $^{+}$  exprimant CD11a sont ceux qui infiltrent le tissu adipeux des sujets obèses. Or, CD11a est une des deux molécules formant le complexe LFA-1, lui-même étant un ligand d'ICAM-1.

Les propriétés immunosuppressives des CSA passent également par la sécrétion de facteurs solubles. En effet, elles peuvent sécréter de l'« indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygénase » (IDO) qui catalyse la conversion du tryptophane en kynurénine. Le tryptophane est impliqué dans la prolifération cellulaire des cellules immunitaires (Munn and Mellor, 2013), alors que la production de kynurénine améliore la différenciation des Tregs (Mezrich et al., 2010) et inhibe la prolifération des lymphocytes T et natural killer (Frumento et al., 2002). La prostaglandine E2 (PGE2) est un autre médiateur majeur de l'immunomodulation des CSA (Gao et al., 2016). En effet, le PGE2 induit la production d'IL-10 par les macrophages qui inhibe les fonctions des cellules natural killer et des T helpers (Eleuteri and Fierabracci, 2019). D'autres facteurs comme le TGF- $\beta$ , la COX2 ou encore l'« hepatocyte growth factor » (HGF) peuvent être impliqués dans l'immunomodulation des CSA (Ceccarelli et al., 2020).



**Figure 19 : Proposition de classification des CSM selon trois classes principales.** Après stimulation, les CSM peuvent se polariser en CSM1 et CSM1' pro-inflammatoire ou CSM2 anti-inflammatoire, présentant des propriétés opposées.

Par ces différents mécanismes, les CSA sont notamment capables d'inhiber la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, les rendant incapables de sécréter des immunoglobulines (Franquesa et al., 2015). De plus, les CSA en co-culture avec des lymphocytes B sont capables de diminuer leurs capacités de migration en régulant l'expression des récepteurs aux chimiokines telles que CXCR4 et CXCR5 (Corcione et al., 2006) par les lymphocytes B. En parallèle, les CSA sont capables de stimuler la différenciation des lymphocytes B régulateurs CD5+ qui sécrètent de l'IL-10 anti-inflammatoire (Peng et al., 2015), elles sont également capables de stimuler la prolifération des lymphocytes B.

En ce qui concerne les lymphocytes T, les CSA ont également une action immunomodulatrice sur ces cellules. L'effet des CSA sur les lymphocytes T est entre autres médié par la production de PGE2 et d'IDO. En effet, elles sont capables d'induire l'arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes T, en G0/G1 (Ahn et al., 2014), ce qui a pour effet d'inhiber leur prolifération. Les CSA sont également capables d'inhiber la différenciation des Th1 et des Th17 mais également d'induire la polarisation des lymphocytes naïfs en Th2 anti-inflammatoires (Ghannam et al., 2010). L'équipe du Dr Eljaafari a également démontré que les cellules souches d'origine mésenchymateuse sont capables d'inhiber la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques CD8+, en inhibant la production d'IL-2 par les lymphocytes T helper (Angoulvant et al., 2004).

Les CSA ont également un effet sur les macrophages et les cellules dendritiques. En effet, l'expression d'IDO par les CSA induit la polarisation des monocytes en macrophages de type M2. De plus, la sécrétion de PGE2 stimule la production d'IL-10 par ces mêmes macrophages (Vasandan et al., 2016). Les CSA sécrètent de l'IL-6 qui, en combinaison avec l'IL-10, est capable d'inhiber la polarisation des macrophages M1 (Melief et al., 2013a). Enfin, les CSA sont également capables d'induire la polarisation des macrophages M2 via la production d'exosomes (Heo et al., 2019). Les CSA ont également un effet inhibiteur sur le nombre et la fonction des cellules dendritiques. En effet, elles diminuent la différenciation des DC immatures en DC matures (Peng et al., 2012). Les CSA diminuent également le recrutement de cellules inflammatoires, en inhibant la sécrétion des chimiokines CCL3 et CCL4 par les DC. Elles inhibent également l'activation des lymphocytes T via les DC en diminuant l'expression du CD86 (molécule de co-stimulation) au niveau des DC (Ivanova-Todorova et al., 2009). L'action des CSA sur les DC passe en partie par la production de PGE2 (Yañez et al., 2010). Le Dr Eljaafari et son équipe ont démontré que l'inhibition de la différenciation des DC, peut se faire également par contact intercellulaire, via la voie Notch (Li et al., 2008), par les CSM.

Néanmoins, les CSA ne présentent pas uniquement des actions anti-inflammatoires. En effet, selon la stimulation et le type de ligand, les CSA peuvent également devenir pro-inflammatoires. Pour ce qui concerne les CSM, la stimulation des CSM de la moelle osseuse a été décrite comme pouvant induire un phénotype pro ou anti-inflammatoire selon le TLR stimulé. En effet, Waterman et son équipe ont montré que la polarisation des CSM 1 pro-inflammatoires ou CSM 2 anti-inflammatoires dépendent de la stimulation par le LPS ou l'acide polyinosinique-polycytidylique (PolyI:C) (Waterman et al., 2010) qui stimulent respectivement le récepteur TLR4 et TLR3. Dans ce contexte les CSM 1 sécrètent plutôt de l'IL6 et de l'IL-8 alors que les CSM 2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles l'IDO, le PGE2 et l'IL-10. Un troisième phénotype a été décrit. La stimulation de CSM par du TGF- $\beta$ 1 en combinaison avec du TNF- $\alpha$  induit la sécrétion par les « CSM 1' » de MCP-1, d'IL-8 et de COX2 via Smad3 et NF- $\kappa$ B (Lerrer et al., 2017) (**Figure 19**). Par ailleurs, le Dr Eljaafari a également montré le rôle des CSM dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, les CSM provenant de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde induisent l'activation des Th17 pathogéniques contrairement aux CSM provenant de patients contrôles, atteints d'ostéoarthrose qui induisent l'activation de lymphocytes Th17 sécrétant seulement de l'IL-17A sans IFN $\gamma$  (Eljaafari et al., 2012)

Ces différents phénotypes sont moins documentés en ce qui concerne les CSA. Néanmoins, une équipe semble rapporter un phénotype CSA 1 et CSA 2 respectivement capables de stimuler et d'inhiber la progression tumorale (Rivera-Cruz et al., 2018).

### C. Les CSA au cours de l'obésité

#### Modification des capacités de prolifération et d'adipogenèse des CSA au cours de l'obésité

Durant le développement de l'obésité, les CSA participent à l'expansion du tissu adipeux. Néanmoins l'augmentation de la prolifération des CSA au sein du tissu adipeux obèse n'est pas clairement établie. En effet, certaines études démontrent une augmentation de la prolifération des CSA au cours de l'obésité alors qu'elle reste stable chez les sujets minces (Maumus et al., 2008). Ces auteurs expliquent l'augmentation de la prolifération des CSA par l'action d'adipokines sécrétées par les adipocytes comme la leptine et l'IL-6, qui sont toutes les deux augmentées durant l'obésité. L'hypoxie favoriserait également la prolifération des CSA *in vitro* via l'expression du FGF-2 et du « vascular endothelial growth factor » (VEGF) induit

lui-même par le facteur de transcription HIF1- $\alpha$  (Kakudo et al., 2015). Néanmoins, d'autres études ont démontré un résultat inverse. En effet, la diminution de la prolifération des CSA obèses par rapport aux CSA minces a été mise en évidence ainsi qu'une diminution de la viabilité des CSA dans le tissu adipeux des sujets en état d'obésité. Cette diminution a été associée à une augmentation des dommages de l'ADN qui augmentent au cours de l'obésité (Pérez et al., 2015) et à un raccourcissement des télomères, suggérant une diminution des capacités d'auto-renouvellement des CSA. Pour réconcilier ces études, une étude ayant analysé les capacités prolifératives des CSA du sujet anciennement obèse, récemment obèse ou minces a permis de déterminer que la prolifération des CSA semble au final augmenter dans les stades précoces d'obésité puis diminuer de façon importante dans les stades plus tardifs (Mitterberger et al., 2014).

Par ailleurs, les capacités de différenciation des CSA en adipocytes semblent également suivre le même cycle d'altération. En effet, des études ont montré que les CSA isolées à des stades précoces d'obésité sont capables d'augmenter l'adipogenèse, alors que les CSA isolées à des stades tardifs démontrent une diminution de leur différenciation en adipocytes (Badimon and Cubedo, 2017). Les capacités de différenciation des CSA sont en fait liées au niveau d'inflammation du tissu adipeux. Au cours de l'obésité, la production de molécules pro-inflammatoires augmente ce qui a pour effet d'inhiber la différenciation des CSA en adipocytes (Badimon and Cubedo, 2017), notamment via la sécrétion d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  (Gustafson and Smith, 2006). En accord, des CSA provenant de femmes ayant subi une chirurgie bariatrique présentent une adipogenèse partiellement restaurée (Silva et al., 2015).

De plus, les modifications des capacités de différenciation et de prolifération des CSA peuvent varier selon leur localisation. En effet, les CSA issues du TAVisc sont moins aptes à proliférer et à se différencier en adipocytes que celles du TAsc. Cela s'expliquerait par une expression plus élevée de C/EBP $\alpha$  par les CSA du TAsc par rapport au TAVisc (Tchkonina et al., 2005). Dans un contexte d'obésité les CSA du TAsc semblent conserver pour partie, leur capacité de différenciation en adipocytes, cependant de façon moindre que chez le sujet mince alors que les CSA du TAVisc présentent une inhibition quasi-complète de l'adipogenèse (De Girolamo et al., 2013).

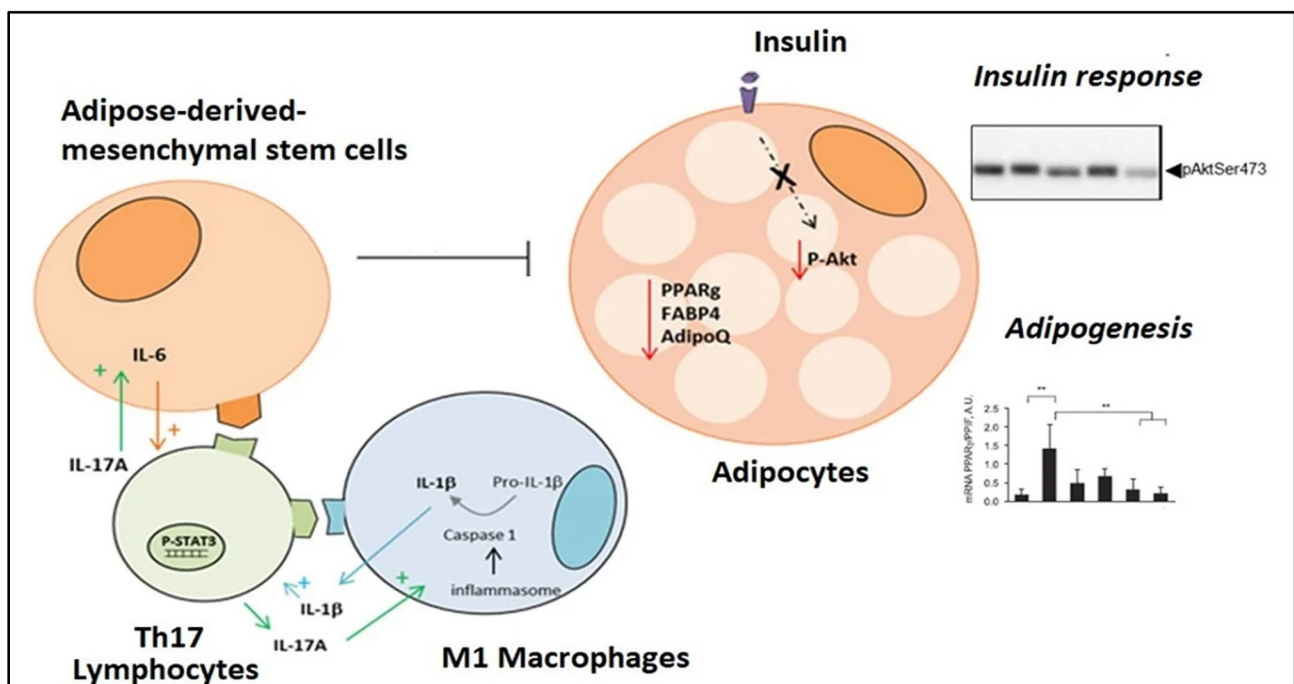


## Voies de signalisation impliquées dans la modulation des fonctions de différenciation et de prolifération des CSA

Plusieurs voies de signalisation, ayant un rôle dans le caractère souche des CSA, sont impliquées dans l'altération des fonctions des CSA, notamment la voie Wnt (Prestwich and MacDougald, 2007), Sonic Hedgehog (Fan et al., 2018) et la voie Notch (Shan et al., 2017). En effet, il a été démontré que des CSA de tissu adipeux provenant de sujets obèses présentent une diminution de leur capacité de différenciation en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes. Cette diminution de différenciation est liée à une altération d'expression de gènes de la voie Wnt, Notch et Sonic Hedgehog (Roldan et al., 2011). L'inhibition de l'adipogenèse par la voie Wnt (Prestwich and MacDougald, 2007), pourrait s'expliquer par l'augmentation de la production d'IL-6 par les CSA du sujet en état d'obésité. En effet, l'IL-6 est connue pour être un activateur de la voie Wnt, tout comme le TNF- $\alpha$  qui est fortement sécrété dans le tissu adipeux au cours de l'obésité (Christodoulides et al., 2009). La voie Notch quant à elle induit également une diminution de la prolifération des progéniteurs adipocytaires. L'activation de la voie Notch diminue en effet la prolifération de ces cellules. De plus, cette même voie inhibe l'adipogenèse. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique sur des cellules souches humaines favorise la différenciation en adipocytes (Vujovic et al., 2007). L'activation de la voie Notch diminue l'expression de PPAR $\gamma$ , de FABP4 et de l'adiponectine (Ugarte et al., 2009). De plus la surexpression de Hes1 (un gène cible de Notch) diminue l'adipogenèse et l'accumulation de lipides dans des CSM porcines (Lei et al., 2013).

## Molécules pro-inflammatoires sécrétées par les CSA issues de sujets en état d'obésité

Les CSA provenant des sujets minces ont largement démontré leur capacité d'immunomodulation, via notamment la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. Cependant, dans un contexte d'obésité les CSA peuvent devenir pro-inflammatoire. Aussi, le TNF- $\alpha$ , surexprimé durant l'obésité, induit une sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par ces mêmes CSA. Le TNF- $\alpha$  a également montré qu'il augmente l'expression de métalloprotéases matricielles (MMP-3, MMP-7) dégradant la matrice extracellulaire (Lee et al., 2010). De plus, le LPS, également présent durant l'obésité du fait de l'augmentation de la perméabilité intestinale, induit la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- $\alpha$  par les CSA (Kilroy et al., 2007). Une étude a également montré que les CSA provenant de sujets obèses expriment en abondance



**Figure 20 : Schéma représentant le rôle des CSAob dans l'activation des lymphocytes Th17. L'environnement inflammatoire résultant de cette polarisation inhibe l'adipogénèse et la sensibilité à l'insuline des adipocytes. (Adapté d'après Eljaafari et al., 2015)**

de l'IL-8, du MCP-1 et de l'IL-6 suggérant que les CSA répondent à l'environnement adipeux obèse par la production de cytokines pro-inflammatoires (Oñate et al., 2013; Pérez et al., 2017). Les CSA issues de patients atteints d'obésité morbide présentent également une augmentation de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 élevée (Silva et al., 2015). La localisation des CSA semble jouer un rôle dans ces modifications de profil inflammatoire. En effet, des CSA provenant du TAVis de femmes obèses sécrètent plus d'IL-6, de MCP-1 et de G-CSF que les CSA provenant de dépôts sous-cutanés ou péritonéaux (Silva et al., 2017), et sont donc plus inflammatoires.

En plus de la sécrétion de cytokines et chimiokines, les CSA issues d'individus obèses sont capables de polariser des cellules immunitaires vers un phénotype pro-inflammatoire. Une étude très récente a démontré que les CSAob sont capables de polariser les macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire, à l'inverse des CSA issues de sujets minces. Dans cette étude, l'utilisation de filtre intercellulaire a permis de mettre en évidence que l'induction de la polarisation des macrophages par les CSA est liée à des facteurs solubles. Les CSA issues de sujets obèses et non minces induisent l'expression d'IL-1 $\beta$  et de iNOS par les macrophages murins. De plus ces mêmes CSA induisent une plus forte migration des macrophages (Harrison et al., 2020). Notre équipe a quant à elle montré que les CSA d'individus en état d'obésité (CSAob) en présence de cellules mononuclées du sang (CMN) de sujets sains sont capables d'induire la polarisation des lymphocytes T vers la voie Th17. Pour ce faire, un modèle de co-culture visant à mimer l'infiltration du tissu adipeux par des cellules immunitaires a été utilisé. En effet, la présence des CSAob, mais pas de CSA issues de sujets minces, a induit la sécrétion d'IL-17A par les lymphocytes Th17 et dans le même temps a inhibé la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-2 par les lymphocytes Th1. L'interaction des CSAob avec les Th17 a également activé la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les monocytes/macrophages et la sécrétion d'IL-6 par les CSAob. Cette polarisation est liée en partie à un contact intercellulaire impliquant ICAM-1. Cependant, nous avons montré l'implication de facteurs solubles sur cette polarisation, puisque l'utilisation de filtre intercellulaire n'inhibe que partiellement la sécrétion d'IL-17A (Eljaafari et al., 2015a). L'étude des mécanismes activés par cette interaction a mise en évidence la contribution de la PI3K, de p-STAT3 et également de l'inflammasome. L'intérêt de ce travail, a porté sur les conséquences de cette inflammation qui a induit l'altération des fonctions des CSA mais également des adipocytes. En effet, notre équipe a démontré que l'environnement inflammatoire, induit par cette co-culture, est capable d'inhiber l'adipogenèse des CSA et la sensibilité à l'insuline des adipocytes différenciés à partir de ces mêmes CSA (**Figure 20**).

## VI. Objectifs

Les objectifs de mon projet de thèse ont été :

- **D'évaluer, à l'aide de notre modèle de co-culture, le rôle de l'IL-17A dans l'altération des fonctions des CSA et des adipocytes et dans la propagation de l'inflammation.**
- **De moduler la réponse inflammatoire médiée par les CSAob en utilisant des  $\omega$ -3, connus pour avoir des effets anti-inflammatoires.**
- **D'évaluer l'effet de la glycation des protéines du sang, notamment de l'albumine glyquée sur cette même réponse inflammatoire.**
- **D'évaluer l'effet de l'inflammation médiée par les CSAob sur la réponse lymphocytaire T, connue pour être altérée chez le sujet obèse, via l'analyse des points de contrôle immuns.**
- **De chercher à mieux comprendre les mécanismes des contacts intercellulaires induisant cette réponse inflammatoire médiée par les CSAob et notamment en s'intéressant à la voie Notch.**

# **Description du modèle de coculture**

Afin de mettre en place notre modèle de co-culture mimant l'infiltration du tissu adipeux par les cellules immunitaires nous devons disposer de cellules souches adipocytaires (CSA) humaines et de cellules mononuclées humaines du sang (CMN). Pour cela les CSA sont isolées à partir de biopsies de tissu adipeux provenant de sujets minces ou en état d'obésité. Les CMN quant à elles sont obtenues à partir de poches de sang de volontaires sains, provenant de l'EFS.

### Isolement des CSA

Les CSA sont obtenues avec le consentement du patient, à partir de biopsies de tissus adipeux provenant de chirurgie bariatrique ou viscérale. Une fois obtenue, la biopsie est découpée puis traitée à la collagénase pendant 40 min afin d'isoler les cellules de la fraction vasculaire stromale (SVF).

La SVF est ensuite mise en culture, après la lyse des globules rouges, dans un milieu DMEM-HAM's /F-12 contenant 10 % de SVF, 1 % de glutamine et 1 % d'antibiotique/antimycotique. Les CSA sont des cellules adhérentes, à l'inverse des immunitaires retrouvées dans la SVF. 24 heures après la mise en culture les cellules en suspension sont retirées par un lavage puis après 2-3 passages, les CSA obtenues sont soit utilisées pour la réaction de co-culture, soit congelées. Néanmoins, avant d'être utilisées pour la co-culture, les CSA sont phénotypées. En effet, il faut vérifier qu'elles expriment le CD73, le CD90 et le CD105 tout en étant dépourvues de CD45. De plus, leurs capacités de multipotence sont évaluées en différenciant les CSA en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes.

### Isolement des CMN

Les CMN sont obtenues à partir de poches de sang provenant de donneurs sains. Le sang est déposé sur un gradient de Ficoll suivi d'une centrifugation de 20 min à 400 g. Nous obtenons alors plusieurs phases. Tout en haut, se trouve le plasma (contenant notamment les plaquettes), puis un anneau de couleur blanchâtre qui correspond aux CMN (lymphocytes et monocytes) et en bas du culot, les globules rouges. Nous éliminons le plasma et récupérons les CMN. Après lyse des globules rouges résiduels, les CMN sont ensuite comptées et cryopréservées avant utilisation pour les expérimentations de co-culture.

### Réaction de co-culture

24 heures avant l'expérimentation, les CSA sontensemencées dans des plaques de cultures de 96 ou 24 puits à une concentration de 20 000 ou 200 000 cellules/puit, respectivement. Le même jour, les CMN sont décongelées puis mises en culture dans des plaques « low adherence » afin de limiter l'adhérence des monocytes. Le lendemain, les CMN sont resuspendues puisensemencées avec les CSA, à une concentration de 100 000 ou 500 000 CMN par puit. Elles sont ensuite activées par la PHA (un mitogène). Selon l'expérimentation, 48 heures (sécrétion cytokinique ou récupération du surnageant) ou 24 heures (expression en ARNm) après activation, l'expérimentation est stoppée. Pour cela les plaques sont centrifugées et les surnageants sont récupérés et congelés. Dans le cas de la mesure d'expression en ARNm, la plaque est également congelée avant extraction des ARNm.



# Résultats



## Article 1

**L'IL-17A contribue à la propagation de l'inflammation, mais n'altère pas l'adipogenèse et/ou la réponse à l'insuline du tissu adipeux chez les individus obèses.**

IL-17A contributes to propagation of inflammation but does not impair adipogenesis and/or insulin response, in adipose tissue of obese individuals.

*Julien Pestel, Marwa Chehimi, Mélanie Bonhomme, Maud Robert, Hubert Vidal, Assia Eljaafari.*

Cytokine, 2020.

## A. Résumé de l'article :

Comme précédemment mentionné, notre équipe a montré le rôle des CSA et des adipocytes (AD) issus du tissu adipeux de sujets en état d'obésité dans la polarisation des lymphocytes Th17 et l'activation des monocytes. De plus, nous avons démontré que l'environnement inflammatoire induit par l'interaction des CSA avec les cellules mononuclées du sang (CMN) inhibe l'adipogenèse des CSA et la réponse à l'insuline des AD. Dans cette étude, nous avons étudié le rôle de l'IL-17A dans l'altération de ces deux fonctions et la capacité de l'IL-17A à propager l'inflammation. Dans ce but, nous avons utilisé le Sécukinumab, un anticorps monoclonal ciblant l'IL-17A humain (Novartis), qui a été précédemment utilisé dans des essais cliniques chez l'Homme, portant notamment sur le psoriasis, pathologie où les lymphocytes Th17 sont impliqués.

- **L'IL-17A n'inhibe pas l'adipogenèse des CSA humaines.** La différenciation des CSA en adipocytes est connue pour induire l'expression de *PPARG*, *FABP4*, *ADIPOQ* (le gène de l'adiponectine) et *LEP* (le gène de la leptine). Pour évaluer l'effet de l'IL-17A nous avons induit cette différenciation en présence d'IL-17A recombinante, mais nous n'avons pas observé d'inhibition de cette fonction, ni même une inhibition de la formation de gouttelettes lipidiques par les adipocytes, contrairement à ce qui avait été montré avec les cellules 3T3 (Zúñiga et al., 2010).

- **Les CSA expriment des récepteurs de l'IL-17A fonctionnels.** De ce fait, pour comprendre les raisons de cette différence avec l'équipe de Zuniga, nous avons alors vérifié si l'absence d'effet de l'IL-17A sur l'adipogenèse n'était pas liée à un défaut d'expression des récepteurs de l'IL-17A au niveau des CSA. Ce n'était pas le cas, puisque nous avons pu montrer que les CSA expriment IL-17RA/RC et que cette expression est maintenue durant la différenciation. De plus, ces récepteurs étaient fonctionnels puisque leur stimulation par l'IL-17A a induit la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8.

- **Le blocage de l'IL-17A ne restaure pas l'adipogenèse.** Ayant précédemment démontré que le milieu conditionné provenant des co-cultures CSA-CMN inhibe l'adipogenèse (Eljaafari et al., 2015a), nous avons analysé l'effet du blocage de l'IL-17A sur cette fonction, en rajoutant un anticorps bloquant l'IL-17A dans le milieu conditionné. Nous avons pu montrer que la présence de cet anticorps n'a pas permis de restaurer l'adipogenèse qui avait été inhibée par le milieu conditionné, ce qui confirme que l'IL-17A n'inhibe pas l'adipogenèse.

**- Le blocage de l'IL-17A ne restaure pas la sensibilité à l'insuline des adipocytes.**

Nous avons également démontré que le milieu inflammatoire provenant des co-cultures inhibe la sensibilité à l'insuline des adipocytes. Cette inhibition se traduit par une diminution de la phosphorylation de l'Akt. Or, l'ajout d'anticorps bloquant l'IL-17A n'a pas non plus permis de restaurer la réponse à l'insuline des adipocytes.

**- L'IL-17A contribue à la propagation de l'inflammation.** Par contre, le surnageant inflammatoire issu de ces co-cultures connu pour induire l'expression d'IL-6, d'IL-8, d'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  par les adipocytes différenciés, a montré une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$ ) par les adipocytes, en présence d'anticorps neutralisant l'IL-17A.

En conclusion dans cet article nous avons démontré que l'IL-17A ne joue pas un rôle majeur dans l'altération de l'adipogenèse des CSA et/ou de la résistance à l'insuline des adipocytes, mais contribue à la propagation de l'inflammation dans le tissu adipeux humain issus de sujets en état d'obésité.

Il a précédemment été démontré que l'IL-17A est capable d'inhiber l'adipogenèse, cependant ces études ont été réalisées grâce à l'utilisation d'une lignée murine d'adipocytes (3T3-L1) ou avec des cellules souches mésenchymateuses humaines (Shin et al., 2009; Zúñiga et al., 2010). Ici en utilisant des CSA issues de sujets en état d'obésité nous n'avons pas reproduit ces résultats. En effet, l'IL-17A n'a pas inhibé l'adipogenèse des CSA contrairement à celle des CSM humaines, utilisées comme contrôle. Pour expliquer cette différence, nous avons mesuré les niveaux d'expression de l'ARNm des IL17RA/RC dans les CSA, ainsi que leur fonctionnalité. Une bonne fonctionnalité de ces récepteurs a été démontrée par leur capacité à induire la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 en réponse à l'IL-17A. Par conséquent, ces résultats suggèrent que l'IL-17A ne joue pas un rôle majeur dans l'altération de l'adipogenèse médiée par l'inflammation, dans le tissu adipeux de sujets atteints d'obésité. En faveur de ces résultats, Caer et ses collaborateurs ont démontré un rôle prépondérant de l'IL-1 $\beta$  mais un rôle plus limité de l'IL-17A dans la lipolyse, la lipogenèse, l'absorption d'acides gras et la sécrétion d'adipokines par des adipocytes primaires humains soumis à un environnement inflammatoire (Caer et al., 2017). Une autre étude a également mis en évidence un rôle restreint de l'IL-17A dans l'inhibition de la différenciation de progéniteurs en adipocytes beiges. En effet l'IL-17A, à l'inverse du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$ , n'a pas drastiquement réduit l'accumulation de lipides et l'expression d'UCP-1 des cellules progénitrices (Estève et al., 2015).

Nous avons ensuite produit un milieu conditionné inflammatoire provenant de co-cultures en présence d'un anticorps dirigé contre l'IL17A. La présence de cet anticorps ne nous a pas permis d'observer une récupération significative de l'adipogenèse. Zuniga et son équipe ont rapporté que l'IL-17A seule est capable d'inhiber l'adipogenèse (Zúñiga et al., 2010). Cependant, ceci a été testé dans la lignée cellulaire murine 3T3 et l'effet était transitoire, puisqu'observé au jour 2, mais pas au jour 6 de différenciation. Cet effet transitoire de l'IL-17A a été confirmé dans leur modèle expérimental *in vivo*, car la protection contre le syndrome métabolique a été perdue au cours du développement de l'obésité et de l'âge des souris déficientes en IL-17A. En effet, les tests de tolérance à l'insuline ont montré une résistance à l'insuline identique chez les souris obèses IL-17A KO âgées de 6 mois que chez les souris sauvages. Les auteurs ont suggéré que l'accumulation de tissu adipeux et/ou l'inflammation liée à l'obésité pouvaient avoir dépassé les effets bénéfiques de l'absence d'IL-17A. Nous suggérons que l'absence d'effet de l'IL-17A sur l'adipogenèse dans notre modèle pourrait être liée au fait que le tissu adipeux, d'où proviennent les CSA, a été récolté chez des donneurs atteint d'obésité, d'un certain âge, ou bien que des molécules inflammatoires provenant de ce milieu conditionné, autres que l'IL-17A pourraient contribuer à l'altération de l'adipogenèse. En effet, l'absence d'effet de l'anticorps bloquant l'IL17A pourrait être liée à l'effet inhibiteur prolongé de cytokines connues pour altérer l'adipogenèse et/ou la réponse insulinaire, telles que l'IL-6 et/ou le TNF $\alpha$ , comme précédemment rapporté (Gustafson and Smith, 2006). Ainsi, nos résultats indiquent que l'IL-17A ne joue pas un rôle majeur dans l'altération de l'adipogenèse ni dans la réponse à l'insuline qui a lieu au sein des CSA issues de sujets adultes en état d'obésité soumises à un environnement inflammatoire.

Enfin, en plus de l'altération de ces deux fonctions, l'obésité est liée à une inflammation du tissu adipeux. L'IL-17A est connue pour exacerber l'inflammation, ce que nous avons pu confirmer en utilisant notre modèle de co-culture. En effet, l'incubation d'AD en présence de milieu conditionné inflammatoire a entraîné une augmentation d'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-8. En utilisant l'anticorps bloquant l'IL-17A, nous avons ensuite mesuré la contribution de l'IL-17A, et nous avons observé une inhibition de l'expression de l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  lors de la présence de l'anticorps au cours la production du milieu conditionné. En effet, la neutralisation de l'IL-17A, une fois le milieu conditionné inflammatoire déjà produit, n'a pas inhibé l'expression des cytokines pro-inflammatoires, suggérant que l'IL-17A agit sur la coopération entre les CSA et les CMN. Le principal rôle de l'IL-17A réside donc dans la propagation de l'inflammation via sa capacité à induire, au niveau

des cellules cibles, l'expression de cytokines inflammatoires telles que le  $TNF\alpha$ , l'IL-6 ou l'IL-1 $\beta$  mais également des chimiokines (CXCL8, CXCL1, CXCL10) et des métalloprotéinases matricielles (Miossec et al., 2009).

A partir de nos données nous pouvons suggérer que suite aux interactions des CMN avec les CSA, un cercle vicieux d'inflammation est induit, où les CSA obèses activent la sécrétion d'IL-17A, qui à son tour contribue à augmenter la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ce sont ces mêmes cytokines qui sont capables de promouvoir la polarisation des Th17. Comprendre les mécanismes d'induction de la polarisation des Th17 par les CSA/adipocytes est donc important pour rompre ce cercle vicieux inflammatoire.





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cytokine](http://www.elsevier.com/locate/cytokine)

# IL-17A contributes to propagation of inflammation but does not impair adipogenesis and/or insulin response, in adipose tissue of obese individuals

Julien Pestel<sup>a,b</sup>, Marwa Chehimi<sup>a,b</sup>, Mélanie Bonhomme<sup>a,b</sup>, Maud Robert<sup>a,b,c</sup>, Hubert Vidal<sup>a,b</sup>,  
Assia Eljaafari<sup>a,b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Inserm U1060-CarMeN, France

<sup>b</sup> University Claude Bernard Lyon 1, France

<sup>c</sup> Hospital Edouard Herriot, Department of Bariatric Surgery, Lyon, France

<sup>d</sup> Hospices Civils de Lyon, France

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Adipose-derived-stem-cells

IL-17A

Obesity

Inflammation

Secukinumab

## ABSTRACT

**Background:** Adipose tissue is infiltrated with various immune cells, including Th17 lymphocytes and monocytes/macrophages, in obese individuals. We have previously demonstrated the role of obese adipose-derived stem cells (ob-ASC) and adipocytes (AD) in the mediation of inflammation through promotion of Th17 cells and activation of monocytes. Such an inflammation resulted in impaired ob-ASC adipogenesis and AD insulin response. In the present study, we investigated the role of IL-17A in the impairment of these functions.

**Methods:** With this aim, we used Secukinumab, a potent human anti-IL17A monoclonal antibody which has been approved for the treatment of some IL-17A related inflammatory diseases, notably Psoriasis. This antibody was added or not to phytohemagglutinin A-activated co-cultures of ob-ASC and mononuclear cells. The conditioning media of those co-cultures were harvested and added to AD ongoing differentiation from ob-ASC. Adipogenesis, insulin sensitivity and secretion of inflammatory cytokines were then measured using qRT-PCR, Western blots and ELISAs, respectively.

**Results:** Surprisingly, we did not observe any direct effect of IL-17A on ob-ASC adipogenesis, despite sensitivity of ob-ASC to IL-17A. Moreover, IL-17A blockade, with the help of Secukinumab, did not lead to the recovery of adipogenesis and insulin response, when these functions were impaired by the presence of an inflammatory conditioning medium. However, the up-regulation of *IL6* and *IL1B* mRNA expression by AD submitted to inflammatory conditioning medium was inhibited in the presence of Secukinumab, which indicates that IL-17A may play a role in the propagation of inflammation towards AD.

**In conclusion:** we show herein that IL-17A does not play a major role in the impairment of adipogenesis and/or insulin resistance mediated by an inflammatory environment, but contributes to the propagation of inflammation in human obese adipose tissues. This suggests a beneficial effect of anti-IL17A mAb in inflammatory pathologies, where obesity contributes to poorer response to biologic treatments.

## 1. Introduction

Obesity is a major worldwide health problem with more than 2 billion adults worldwide being overweight (BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>), and 671 millions of them clinically obese (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) [1]. Accordingly, it is predicted that more than 51% of the global population will be obese by 2030 [2]. Hypertension, type 2 diabetes (T2D), atherosclerosis,

hyperlipidemia, which define the “metabolic syndrome” are a classical consequence of obesity [3]. Adipose tissue (AT) inflammation is considered as one of the causal events leading to insulin resistance, and type 2 diabetes. Indeed, at an advanced stage of obesity, AT becomes heavily infiltrated by a variety of immune cells involved in inflammation, such as CD8<sup>+</sup> T cells and macrophages [4]. A recently discovered T-cell lineage that may play a role in AT inflammation, i.e., the T-helper

**Abbreviations:** Ob-ASC, adipose-derived stem cells from obese individuals; MNC, mononuclear cells; PHA, phytohemagglutinin A; SD, standard deviation; CM, conditioning medium; T2D, type 2 diabetes; AT, adipose tissue; Th17, T-helper 17; DIO, diet-induced obesity; IL-17, interleukin 17; TBP, tata box binding protein; NASH, non-alcoholic steatohepatitis syndrome; FCS, fetal calf serum

\* Corresponding author at: Inserm U1060-CarMen, Faculty of Medicine Lyon Sud, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre Benite, France.

E-mail addresses: [julien.pestel@univ-lyon1.fr](mailto:julien.pestel@univ-lyon1.fr) (J. Pestel), [maud.robert@chu-lyon.fr](mailto:maud.robert@chu-lyon.fr) (M. Robert), [hubert.vidal@univ-lyon1.fr](mailto:hubert.vidal@univ-lyon1.fr) (H. Vidal), [assia.eljaafari@univ-lyon1.fr](mailto:assia.eljaafari@univ-lyon1.fr) (A. Eljaafari).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154865>

Received 5 February 2019; Received in revised form 24 September 2019; Accepted 25 September 2019

1043-4666/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

17 (Th17) cell subset, mainly secretes IL-17A and IL-17F pro-inflammatory cytokines. IL-17A/F receptors are involved in inflammation spreading due to their ubiquitous expression [5], and their ability to activate secretion of metalloproteinases and pro-inflammatory cytokines, following IL-17A binding [6]. Both in human and rodent models, obesity has been shown to promote expansion of IL-17-producing T cells in AT and other tissues [7–10]. Thus, using the diet-induced-obesity (DIO) murine model, Winer et al. have shown selective activation of splenic IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, without modification of Th1 and Th2 pools [11]. Accordingly, circulating IL-17 and IL-23 cytokines were observed in obese subjects, as opposed with lean individuals [8]. Infiltrating IL-17A<sup>+</sup>-secreting cells were also found to be more abundant in AT from obese rather than lean individuals, and in visceral, rather than subcutaneous AT depots [9,12]. Moreover, Dalmas et al. have reported that populations of IL-17A<sup>+</sup>-secreting cells are induced in the mucosal tissues of obese subjects, when compared to non-obese individuals. In addition, they have also demonstrated that T2D further increased the frequency of IL-17A<sup>+</sup>-secreting cells [13]. Supporting the implication of IL-17A in the metabolic syndrome, the levels of *IL17R* expression in liver or muscle were shown to correlate with insulin-resistance [7], and blocking IL-17A resulted in decreasing hepatic inflammation in the non-alcoholic steatohepatitis syndrome (NASH) [14]. Recently, we have reported that adipose-derived-stem cells and adipocytes (AD) from obese, but not lean donors, contribute to Th17 promotion, IL-1 $\beta$ , and IL-6 secretion, through contact-dependent interactions with blood mononuclear cells (MNC) and soluble factor secretion [15,16]. In addition, we have demonstrated that the inflammatory environment induced by ob-ASC-MNC interactions inhibited adipogenesis and insulin response in AD differentiated from ob-ASC. Therefore, using this model, we investigated herein whether the blockade of IL-17A would restore (i) adipogenesis, (ii) insulin sensitivity, and/or (iii) would block inflammation of ob-ASC/AD. With this aim, we used Secukinumab, a monoclonal antibody targeting the human IL-17A, that has been validated in human clinical trials, and particularly in Psoriasis, a Th17-mediated auto-immune disease [17].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation and expansion of ob-ASC

Subcutaneous or visceral AT samples were isolated from residues of bariatric surgery of 6 obese subjects (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>), with the approval of the Committee for the Protection of Human Subjects of the “Hospices Civils de Lyon” and with the informed patient consent. AT samples (50–100 mg) were fragmented and incubated in 2 g/L of collagenase type Ia solution (Sigma Aldrich, C2674) dissolved in DMEM:F12 medium (50/50 vol/vol) (Invitrogen) for 40 min at 37 °C by mixing. Collagenase action was quenched by the addition of 1:1 vol/vol of DMEM:F-12 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS). The released stromal vascular fraction (SVF) was recovered by centrifugation (800 g for 7 min at 25 °C). Residual red blood cells were lysed by hypotonic shock and the ASC component of SVF was selectively expanded in culture medium composed of DMEM:F-12 supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L L-glutamine and 100 U/mL penicillin-streptomycin. Half of the culture medium was changed every two to three days. ASC were amplified by several passages in culture (3 to 4) and directly used for experiments or stored in liquid nitrogen. The pluripotent phenotype of ASC was validated by differentiating ASC into AD, or osteoblasts, depending on the differentiation medium used, as previously reported [15]. ASC phenotype was assessed by staining with FITC, PE, or APC conjugated mouse anti-human cell surface markers (from ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Germany) as recommended by

the French Cell Therapy Society [18], and revealed a CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, and CD45<sup>-</sup> pattern very similar to that of the human MSC used as control (Supplementary Fig. 1).

### 2.2. Isolation of blood mononuclear cells (MNC)

Blood samples were obtained through the Blood Bank Center of Lyon (France), following institutionally approved guidelines. MNC were harvested from healthy human peripheral blood by density gradient centrifugation (Ficoll-Histopaque, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). MNC were stored in liquid nitrogen prior to use.

### 2.3. Preparation of the conditioning media

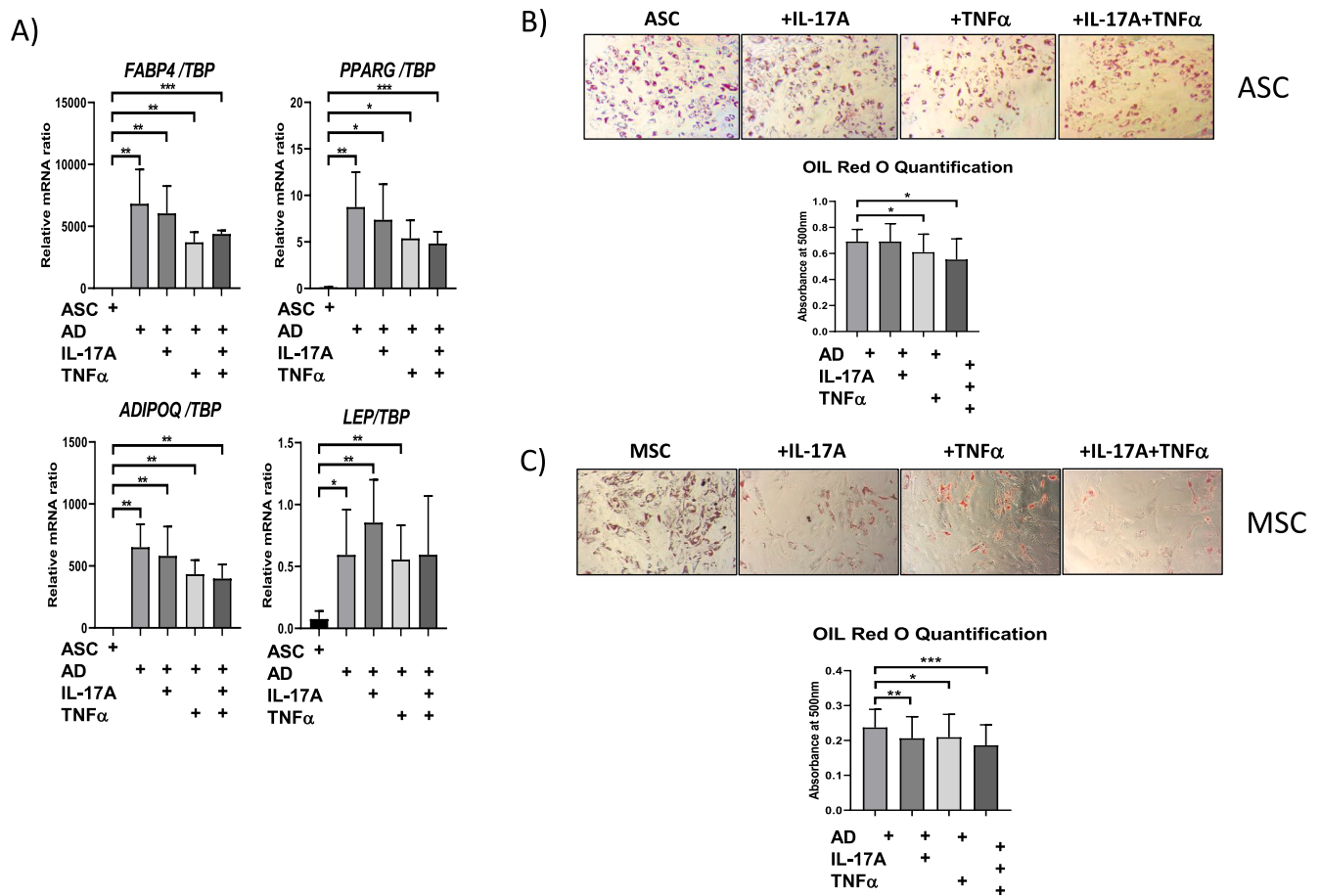
Ob-ASC were harvested and seeded in 96-well plates (20,000 cells/well) for 18–24 h. 100,000 MNC were co-seeded for 48 h in the presence or absence of phytohemagglutinin (PHA), 5  $\mu$ g/ml, (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). ASC, MNC, or ASC/MNC co-cultures, were treated with indicated doses of IL-17A neutralizing antibodies (Secukinumab, was provided by Novartis), as indicated in the relevant Figure legends. After 48 h, supernatants were harvested and frozen.

### 2.4. Differentiation of obese subcutaneous ASC or MSC into AD

ASC from subcutaneous AT of obese donors (ob-ASC) were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells per well in a 12-well plate (3.8 cm<sup>2</sup>/well) containing basal culture medium (DMEM:F-12 medium, 1:1 vol/vol supplemented with 10% FCS) for 2 days. Cells were induced to differentiate into AD, using an adipogenic culture medium composed of basal culture medium supplemented with 1.8  $\mu$ M insulin, 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 500 nM dexamethasone, 1  $\mu$ M rosiglitazone, 2 nM triiodothyronine and 10  $\mu$ g/ml transferrin (all from Sigma-Aldrich). During differentiation, the culture medium was replaced every two to three days up to 8 days. When indicated, differentiating AD were treated or not the last two days, with conditioning medium harvested from co-cultures, or with recombinant human IL-17A (50 ng/mL) and/or TNF $\alpha$  (1 ng/mL). For human mesenchymal stem cells (MSC), following expansion, in MEM-alpha supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L L-glutamine and 100 U/mL penicillin-streptomycin, differentiation into AD was induced with the same culture conditions than for ASC differentiation.

#### 2.4.1. Oil Red O staining and quantification

Oil Red O staining serves as an indicator of intra-cellular lipid accumulation. It was thus used to assess for AD differentiation. At day 8, the adipogenic culture medium was removed, cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and fixed using 10% formaldehyde (in PBS) for 1 h at room temperature. The fixative was removed and replaced with 60% isopropanol, in order to totally dry cells. AD were stained for 10 min at room temperature with Oil Red O ready used solution (Merck, Darmstadt, Germany). Cells were then washed 3 to 4 times with PBS to remove excess stain. Photos were taken using ZEN Microscope version 2012 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Quantification was assessed using a spectrophotometer after elution of Oil Red O staining with 100% isopropanol and absorbance was measured at 500 nm. When required, an alternative method consisted in measuring Oil Red O area using the Image J software relative to cell number.



**Fig. 1. IL-17A does not impair adipogenesis in human obese ASC.** Ob-ASC were differentiated or not into AD, using an adipogenic differentiating medium. Recombinant human IL-17A (50 ng/mL) plus or minus TNFα (1 ng/mL) were added to the adipogenic differentiating medium from the first day and during 5 to 8 days. A. After 5 days, gene expression levels of adipogenic genes *FABP4*, *PPARG*, *ADIPOQ* and *LEP* were measured to assess adipocyte differentiation. Results were normalized to *TBP*, a housekeeping gene. B. and C. After 8 days of differentiation, an Oil Red O staining of AD (AD) differentiated from ASC (B), or MSC (C) was performed. Photos of stained oil droplets were realized, and quantified. Fig. 1A is representative of 2 analyses, with 2 different ASC. Error bars represent standard deviations (SD) from n = 3 independent experiments in duplicates (A), or triplicates (B, C). \*, \*\*, \*\*\*, represent p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001, as obtained by the one-way ANOVA test, followed by Bonferroni (A), or Dunett multiple comparison tests (B, C).

2.5. Co-culture assays

ASC or AD (differentiated for 5 to 8 days) were harvested and seeded in 96-well plates (20,000 cells/well) for 18–24 h in 200 μl of basal culture medium (DMEM:F-12 medium, 1:1 vol/vol supplemented with 10% FCS). 100,000 MNC were co-seeded for 48 h in the presence or absence of phytohemagglutinin (PHA, 5 μg/ml, Sigma-Aldrich). Ratios 1:5 were used for ASC:MNC or AD:MNC co-cultures. Cells were incubated in RPMI supplemented with 10% FCS. Supernatant was harvested after 48 h, and frozen.

2.6. Flow cytometry

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated, phycoerythrin (PE)-conjugated, Allophycocyanin (APC)-conjugated mouse anti-human CD73, CD90, CD105, CD45, (all from Immunotools) were used to label the various cells tested. Analyses were performed using the « LSR II 3 lasers » cytofluorometer and the Diva software (both were from BD Biosciences).

2.7. Cytokine secretion

IL-17A, IL-1β, IL-6 and TNFα secretions were measured by ELISA, using the corresponding antibodies (e-Biosciences, Paris, France).

2.8. Western-blot analysis

AD were lysed, proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were then immunoblotted with the appropriate antibodies to detect phosphorylated AKT (pAKT) and total AKT (Cell Signaling Technologies, Danvers, Massachusetts, USA). Antibody binding was then detected by using HRP-conjugated secondary antibodies and Luminata Forte western HRP substrates (Merck). Immunoblots were visualized by a chemiluminescence imaging system.

2.9. mRNA measurements

Total RNA was extracted from co-cultures using the Tri Isolation Reagent™ (Roche, Meylan, France). RNAs were stored at -80 °C. cDNA was synthesized from 250 ng of total RNA using the Primescript™ RT reverse transcription kit (Takara, Dalian, Japan) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed in duplicate on a Rotor-gene Real-time PCR System, using the Absolute™ qPCR SYBR Green Mix (ABgene, Illkirch, France). Quantitative data were defined by threshold cycle (Ct) normalized for the housekeeping gene TATA Box Binding Protein (*TBP*). The individual primer sequences used for qRT-PCR were as follows, except if they were purchased from Qiagen (QuantiTect Primer Assays, Qiagen, Hilden, Germany), which was the case for human *IL17RA* and *IL17RC*.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>FABP4</i>	5'-CTGGTACATGTGCAGAAATGG-3'	5'-GAACCTCAGTCCAGGTCAACG-3'
<i>PPARG</i>	5'-TCTCTCCGTAATGGAAGACC-3'	5'-GCATTATGAGACATCCCCAC-3'
<i>ADIPOQ</i>	5'-AGGCCGTGATGGCAGAGATG-3'	5'-CTTCCAGGTTCTCCTTCCTGC-3'
<i>LEP</i>	5'-CACCAGGATCAATGACATTTTC-3'	5'-TGCCAGTGTCTGGTCCATCTTG-3'
<i>IL6</i>	5'-AGCCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAG-3'	5'-TTCTGCAGAACTGGATCAGGACTTT-3'
<i>IL1B</i>	5'-GGCAATGAGGATGACTTGT-3'	5'-TGTAGTGGTGGTCCGAGATT-3'
<i>IL8</i>	5'-TTCTGCAGCTCTGTGAAG-3'	5'-ACAGAGCTCTTCCATCAG-3'
<i>TNFA</i>	5'-ACAGAGCTCTCTCCATCAG-3'	5'-GAGGTACAGGCCCTCTGATG-3'

2.10. Statistical analysis

The one-way ANOVA test, with or without repeated measures, was used, depending on whether experimental conditions were repeatedly applied to each sample, or not. When some values were missing, mixed effects analyses were used, with the help of the Graphpad Prism 8 software. Post hoc Dunnett, or Bonferroni multiple comparison tests were used, depending on whether a comparison to a control was required or not, respectively. Differences were considered as statistically significant, when  $p < 0.05$ .

3. Results

3.1. IL-17A does not impair adipogenesis in human obese ASC

IL-17A has been shown to inhibit adipogenesis via PPAR $\gamma$  and other factors in murine and human AD [19–21]. However, these data were obtained using either the murine 3T3–L1 cell line able to differentiate into AD [19,20], or human MSC [21]. Moreover, in one of these studies, TNF $\alpha$  was added together with IL-17A [19]. Therefore, to test whether IL-17A could mediate adipogenesis inhibition in human ASC, we

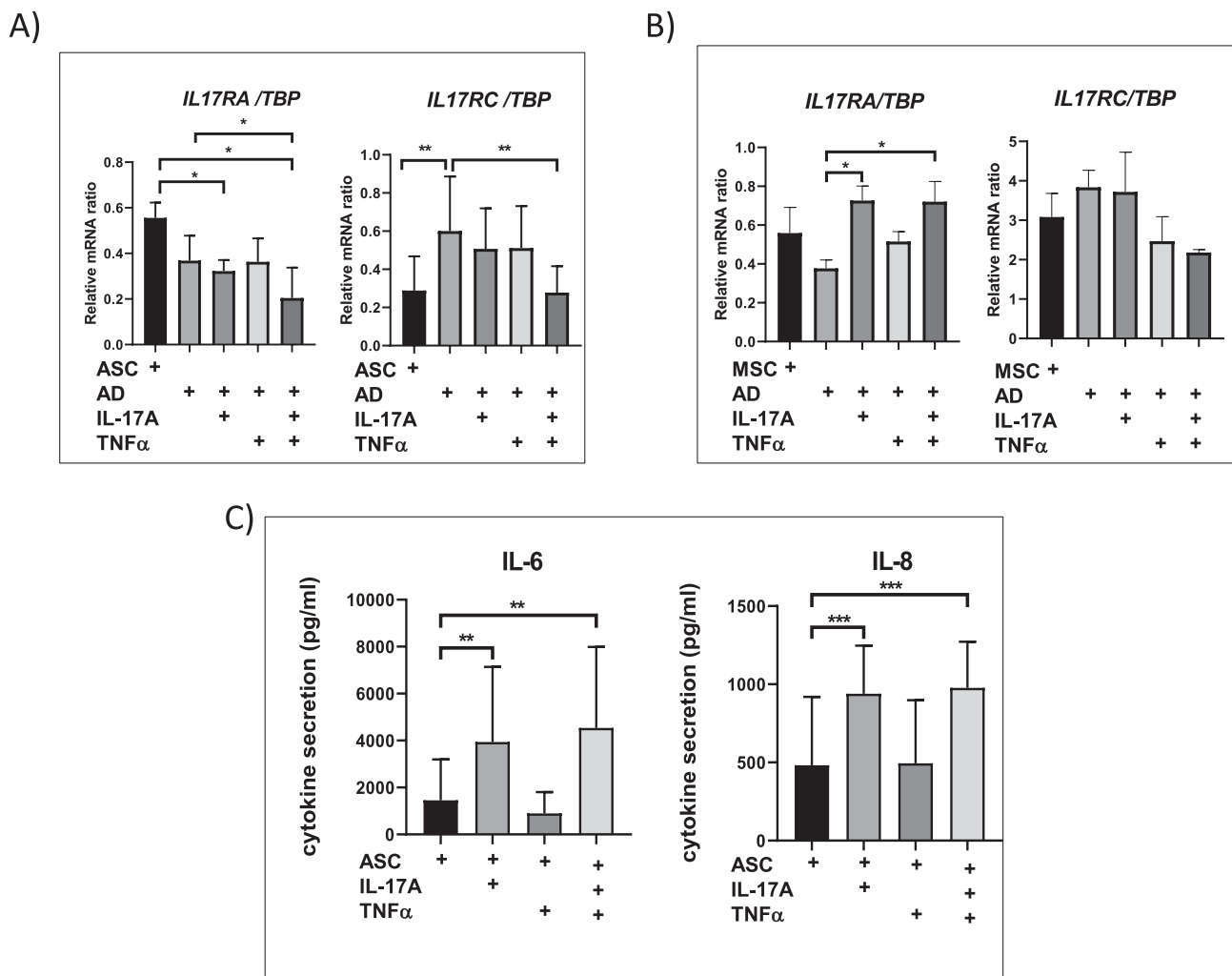
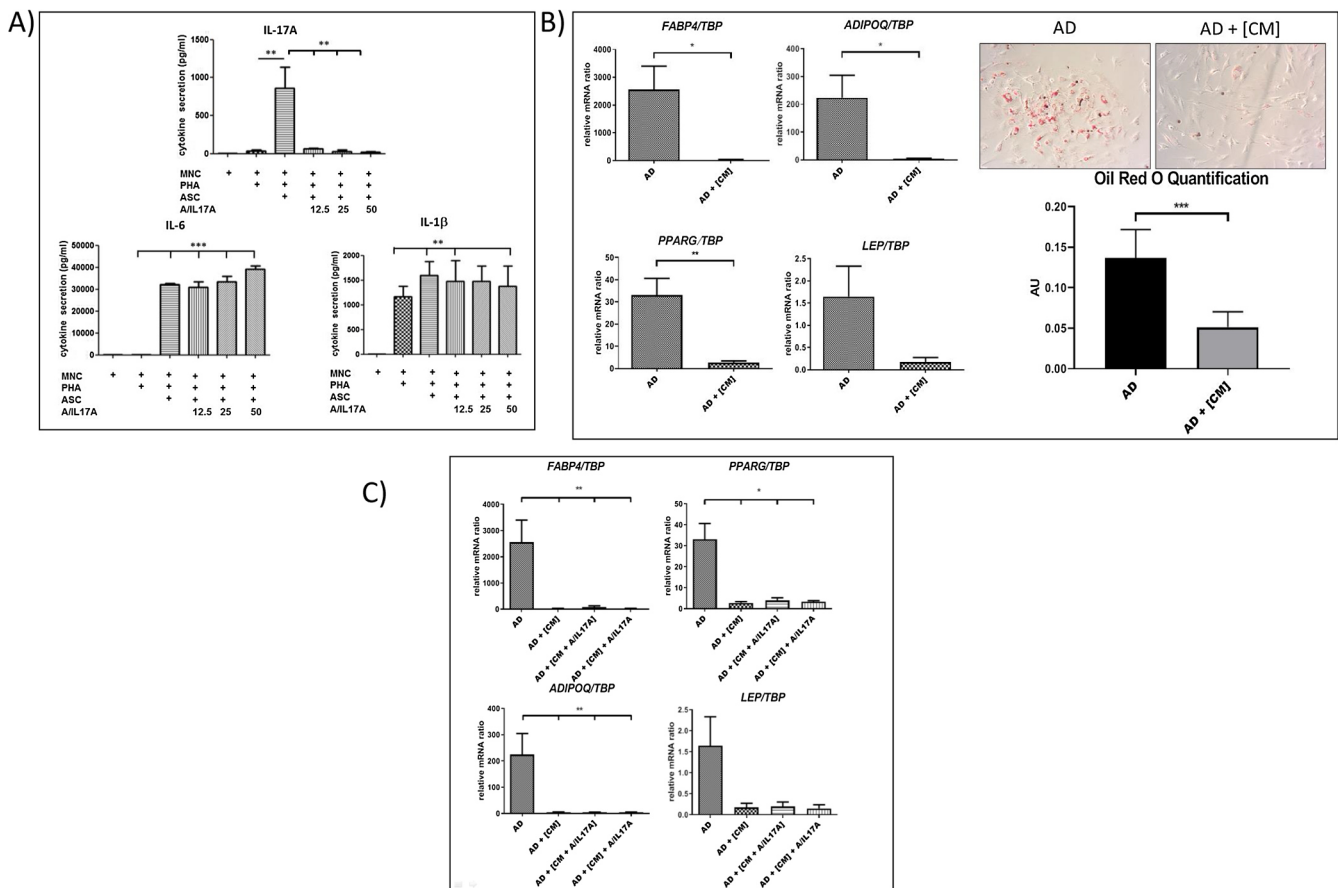


Fig. 2. Ob-ASC express functional receptors for IL-17RA/RC. The *IL-17RA/RC* mRNA expressions of ASC and MSC were measured by qRT-PCR at days 0 and 5 of differentiation (A,B) in the presence of recombinant human IL-17A (50 ng/mL) plus or minus TNF $\alpha$  (1 ng/mL). Results were normalized to *TBP*, a housekeeping gene. C. Cell culture supernatants were further analyzed by ELISA for the secretion of IL-6 and IL-8 cytokines. Error bars represent standard deviations (SD) from  $n = 3$  independent experiments. \*, \*\*, \*\*\*, represent  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , as obtained by the one-way ANOVA, followed by Bonferroni (A, B) or Dunnett (C) multiple comparison tests.



**Figure 3**

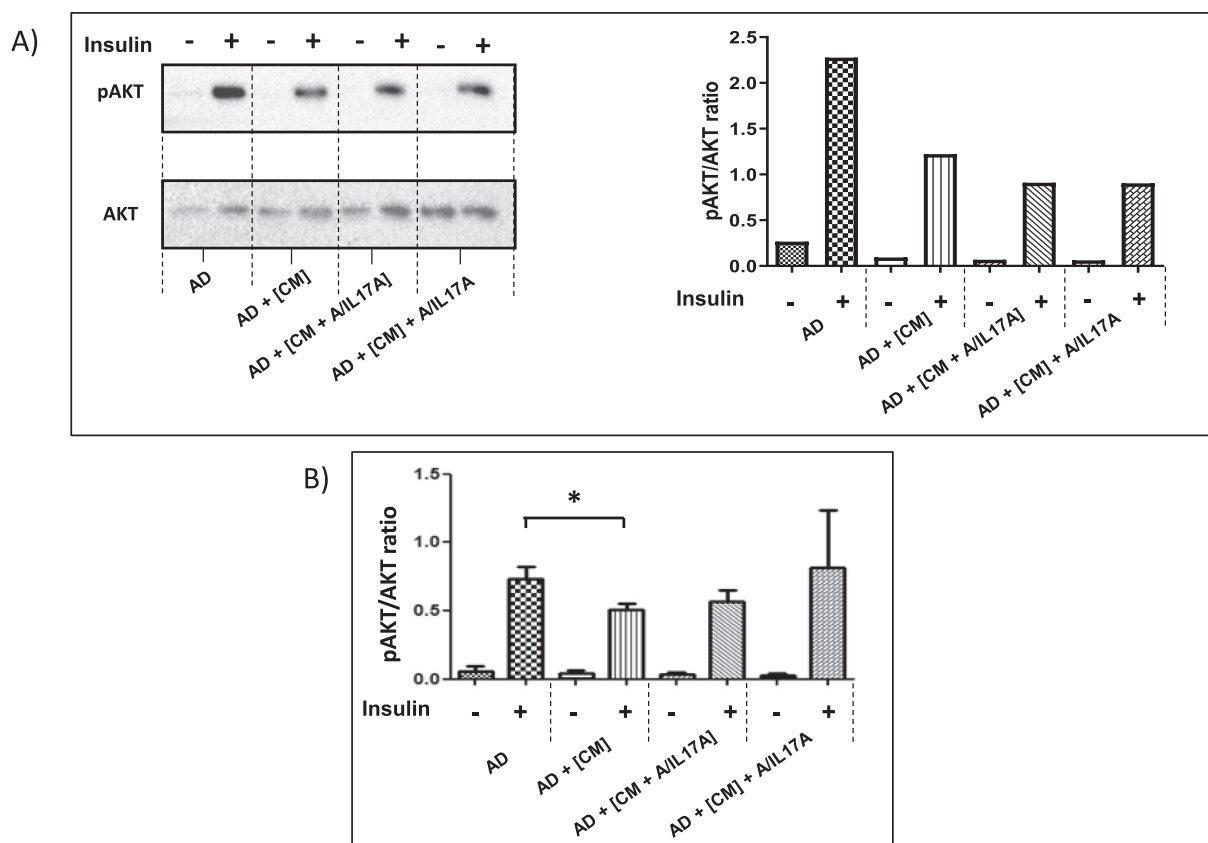
**Fig. 3. The blockade of IL-17A does not restore adipogenesis in ob-ASC submitted to an inflammatory environment.** A. MNC were activated or not with PHA (5 μg/mL) and cocultured in the presence or absence of ob-ASC for 48 h. Graded concentrations of anti-human IL-17A mAb (A/IL17A) were added to these cultures, or not. Cell culture supernatants were harvested and further analyzed by ELISA, for the secretion of IL-17A, IL-1β and IL-6. B. The last two days of ob-ASC differentiation, inflammatory conditioning medium harvested from PHA activated MNC/ob-ASC cocultures was added (AD + [CM]), or not (AD) to the differentiating medium. Gene expression levels of adipogenic genes *FABP4*, *PPARG*, *ADIPOQ* and *LEP* were measured to assess for adipocyte differentiation. Results were normalized to *TBP*, a housekeeping gene. Photos and quantification of Oil Red O staining were performed. C. The anti-IL17A mAb (A/IL17A) was added either during inflammatory CM production (AD + [CM + A/IL17A]), or together with CM (AD + [CM] + A/IL17A). *FABP4*, *PPARG*, *ADIPOQ* and *LEP* mRNA levels were measured to validate adipocyte differentiation. Results were normalized to *TBP*. Error bars represent standard deviations (SD) from n = 3 independent experiments performed in triplicates (A), or duplicates (B,C). \*, \*\*, \*\*\*, represent p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001 as obtained by the one-way ANOVA test, followed by Bonferroni (A, C), or Dunnett (B) multiple comparison tests.

differentiated ASC harvested from obese individuals into AD, and added IL-17A in the presence or absence of suboptimal doses of TNFα, at concentrations that we have previously shown to be efficient in contributing to bone destruction [22]. ASC fully differentiated into AD in these various conditions, as assessed by the increase of *PPARG*, *FABP4*, *ADIPOQ*, and *LEP* mRNA expressions (Fig. 1A). But, we did not observe any significant decrease in adipogenesis, and/or adipocyte mRNA markers, when ASC were induce to differentiate into AD in the presence of IL-17A and/or TNFα. IL-17A did not decrease oil droplet staining, neither. However, in the presence of TNFα, a significant reduction in Oil red O staining was observed without any potentiation by IL-17A (Fig. 1B). Finally, as control and as already reported [21], MSC differentiation into AD was inhibited in the presence of IL-17A, and/or TNFα (Fig. 1C). Thus, these results indicated that, as opposed with human MSC, IL-17A did not impair adipogenesis in human ob-ASC.

### 3.2. Ob-ASC express functional receptors for IL-17RA

To try to explain the discrepancies between ASC and MSC, we then measured the expression of *IL17RA/RC* at the mRNA level in ob-ASC or MSC ongoing differentiation, in the presence or absence of IL17A and/

or TNFα. As shown in Fig. 2A, we observed that the expression of *IL17RA* in ASC was maintained upon differentiation, while that of *IL17RC* increased. The presence of IL-17A during differentiation did not lead to any modulation in the expression of these receptors, when compared to AD. But, the concomitant action of IL-17A plus TNFα resulted in a decrease of *IL17RA* and *IL17RC* mRNA expression levels. In MSC, results showed that IL-17A up-regulated *IL17RA* mRNA expression (Fig. 2B). Thus, this demonstrated that *IL17RA* gene expression was differentially regulated by IL-17A, in AD differentiated from ASC versus MSC. We then analyzed the functionality of these receptors. To this aim, as we have previously reported that IL-17A upregulates the production of IL-6 and IL-8 by human MSC [23], we measured the ability of ob-ASC to up-regulate pro-inflammatory cytokine secretion, in the presence of IL-17A, with or without TNFα. As shown in Fig. 2C, we observed that IL-17A, but not TNFα, strongly up-regulated the levels of IL-6 and IL-8 cytokine secretion, as measured by ELISA. Therefore, our data clearly indicated that ob-ASC were sensitive to IL-17A, and that a defect in *IL17RA/RC* mRNA expression could not account for the absence of adipogenesis impairment by IL-17A.



**Fig. 4. The blockade of IL17A does not restore insulin sensitivity in AD submitted to an inflammatory environment.** AD treated with the inflammatory CM (AD + [CM]) were stimulated with 100 nmol/L insulin for 15 min, or not (AD). The anti-IL17A mAb (A/IL17A) was added either during inflammatory CM production (AD + [CM + A/IL17A]), or together with CM (AD + [CM] + A/IL17A). Western blot analysis of pAKT-Ser473 and total AKT, after stripping, were used in order to evaluate PI3K activity and thus, insulin sensitivity. Quantification of pAKT was normalized on total AKT levels. A. A representative experiment. B. Mean of four independent experiments. Error bars represent standard deviations (SD) from  $n = 4$  independent experiments. \* represents  $p < 0.05$  as obtained by the one-way ANOVA test, followed by Bonferroni multiple comparison tests.

### 3.3. The blockade of IL-17A does not restore adipogenesis, in ob-ASC submitted to an inflammatory environment

Because we have previously developed a co-culture model, where ob-ASC promoted IL-17A production by T cells, IL-1 $\beta$  by monocytes, and IL-6 by themselves [15], we tested herein, whether Secukinumab, an anti-human IL-17A monoclonal antibody (mAb), would inhibit the secretion of these cytokines. To evaluate the effects of this mAb, we added the anti-IL17A mAb at graded concentrations from the beginning of co-cultures of ob-ASC with MNC. As shown in Fig. 3A, IL-17A, IL-1 $\beta$ , and IL-6 secretions were up-regulated in the presence of ob-ASC/MNC co-cultures, as compared to MNC. The anti-IL17A mAb markedly inhibited IL-17A detection in the ELISA, starting from the lowest concentration tested, i.e., 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , whereas, IL-6 and IL-1 $\beta$  were not inhibited, assessing thus for the specificity of this mAb. As previously reported [15], we showed that addition of a conditioning medium (CM) harvested from PHA-activated ASC-MNC co-cultures the last two days of ob-ASC differentiation resulted in a profound decrease in adipogenesis and/or adipocyte markers, such as *FABP4*, *PPARG* and *ADIPOQ* mRNAs, and of Oil Red O staining (Fig. 3B). Therefore, to investigate whether IL-17A was involved in CM-mediated adipogenesis inhibition, the anti-IL17A mAb was added at the highest concentration either (i) throughout the whole period of the co-culture from which CM was harvested, which resulted in the neutralization of IL-17A and inhibition of its effects on surrounding cells such as monocytes, or ASC, or (ii) together with the inflammatory CM, in order to neutralize IL-17A and inhibit its effects on ASC during differentiation. Results showed that, while adipogenesis was profoundly inhibited by the inflammatory CM,

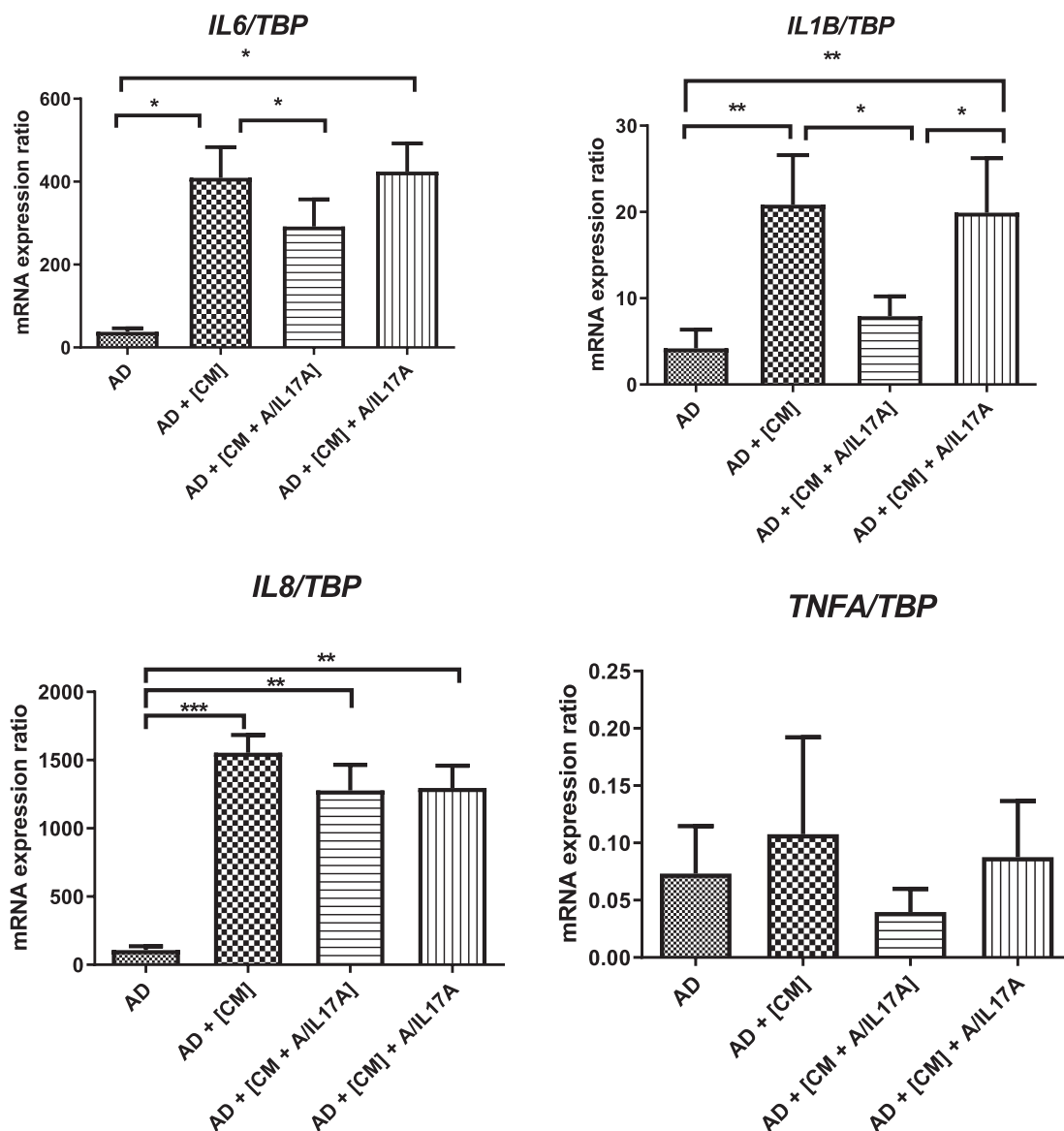
addition of anti-IL17A did not lead to any significant recovery of adipogenesis (Fig. 3C). Thus, our results indicated that IL-17A did not play a major role in inflammatory CM-mediated adipogenesis inhibition.

### 3.4. IL-17A blockade does not restore insulin sensitivity, in AD submitted to an inflammatory environment

As we have previously reported that addition of a CM harvested from PHA-activated ASC-MNC co-cultures the last two days of ob-ASC differentiation resulted in decreasing their insulin response [15], we then tested whether the anti-IL17A mAb would restore this function. As shown in Fig. 4, although the presence of the inflammatory CM resulted in a significant decrease of pAKT/AKT levels, addition of the CM harvested from co-cultures deprived of IL-17A effects on surrounding cells, or of the CM mixed with anti-IL17A mAb, did not significantly restore insulin sensitivity in any of these conditions, as measured by pAKT/AKT levels. However, a trend towards a positive effect of anti-IL17A on insulin response recovery was suggested. Indeed, when anti-IL17A was added to CM, pAKT/AKT levels did not significantly differ from those of AD (Fig. 4). Thus, these results suggested that IL-17A did not play a major role in the impairment of the insulin response in obese AD submitted to an inflammatory environment.

### 3.5. IL-17A contributes to ob-ASC-mediated inflammation

We then analyzed the impact of the inflammatory CM on adipocyte pro-inflammatory cytokine secretion. As shown in Fig. 5, we observed that the presence of the inflammatory CM on the last two days of



**Fig. 5. IL-17A contributes to ob-ASC-mediated inflammation.** The last two days of ob-ASC differentiation, AD were treated with the inflammatory conditioning medium (AD + [CM]) harvested from PHA activated MNC-ob-ASC cocultures, or not (AD). Anti-IL17A mAb was added either during CM production (AD + [CM + A/IL17A]), or together with CM (AD + [CM] + A/IL17A). *IL6*, *IL1B*, *IL8* and *TNFA* mRNA levels were measured. Results were normalized to *TBP*. Error bars represent standard deviations (SD) from n = 3 independent experiments in duplicates. \*, \*\*, \*\*\*, represent p < 0.05, p < 0.01, p < 0,001 as obtained by the one-way ANOVA test, followed by Bonferroni multiple comparison tests.

differentiation resulted in a strong increase of *IL6*, *IL1β* and *IL8*, but not *TNFA* mRNA expression by AD differentiated from ob-ASC. We then tested in this model, the effects of IL-17A blockade, and observed that the anti-IL17A mAb was able to inhibit part of this inflammation, since a significant decrease of *IL1B* and *IL6* mRNA expression was observed. *IL8* mRNA levels also decreased but not sufficiently enough to reach statistical significance. However, this inhibition occurred only when the anti-IL17A mAb was added during the production of the inflammatory CM. Indeed, when the anti-IL17A mAb was added together with the inflammatory CM during the last two days of differentiation, no inhibition of pro-inflammatory cytokine secretion was observed.

Therefore, these results suggested that the cooperation between T cells and AD induced IL-17A secretion, which contributed in turn to up-regulate IL-1β, and IL-6 cytokine secretion by AD.

#### 4. Discussion

IL-17A has been reported to inhibit adipogenesis. However, this was

performed using a murine preadipocyte cell line, or human MSC [19–21]. Using human ob-ASC, we were unable to reproduce these results, whether TNFα was added or not together with IL-17A (Fig. 1(A and B)), in contrast to human MSC (Fig. 1C). To explain these discrepancies, we measured the levels of *IL17RA/RC* mRNA expression in ASC and compared them to MSC. *IL17RA* expression was differentially regulated by IL-17A in AD differentiated from ASC or MSC (Fig. 2A and B). However, a good functionality of these receptors was further demonstrated by their ability to up-regulate IL-6 and IL-8 cytokine secretion under the influence of IL-17A (Fig. 2C). Therefore, these results support that IL-17A may not play a major role in the inflammation-mediated adipogenesis impairment, in human obese AT. Caer et al reported a weak contribution of IL-17A in metabolic deregulation and defective lipid storage, in human primary AD submitted to an inflammatory environment [24]. We then produced an inflammatory CM by co-culturing ob-ASC with MNC and neutralized IL-17A in order to inhibit its effects on surrounding cells by adding the anti-IL17A mAb throughout the co-cultures. While CM strongly inhibited ASC

differentiation into AD (Fig. 3B), we did not observe any significant recovery of adipogenesis in the presence of anti-IL17A mAb (Fig. 3C). We also added the anti-IL17A mAb together with the inflammatory CM on differentiating AD, to directly neutralize IL-17A and inhibit its putative effect on ob-ASC ongoing differentiation, but here again adipogenesis did not recover (Fig. 3C). Zuniga et al. reported that IL-17A alone is able to inhibit adipogenesis [20]. However, this was tested in the murine 3T3 cell line and the effect was transient, since observed at day 2, but not at day 6 of differentiation. This transient effect of IL-17A was confirmed in their *in vivo* experimental model, as protection from the metabolic syndrome was lost with the development of age-associated obesity in IL-17A deficient mice. Indeed, insulin tolerance tests showed as much impaired response in 6-mo-old obese IL-17A KO mice than WT mice. The authors suggested that accelerated AT accumulation, and/or obesity-related inflammation, might have overwhelmed the beneficial effects of IL-17 deficiency. Based on these data, one can suggest that the absence of IL-17A effects on adipogenesis in our model could be related to the fact that AT was harvested from adult and obese donors, and/or that AT-associated inflammatory factors other than IL-17A could contribute to adipogenesis impairment. Indeed, one possibility to explain the absence of anti-IL17A effect could be related to the sustained inhibitory effect of cytokines known to impair adipogenesis and/or insulin response, such as IL-6 and/or TNF $\alpha$ , as previously reported [25]. Nevertheless, in accordance with the absence of IL-17A effects on glucose metabolism reported by Zuniga et al. [20], we observed that AD differentiated from obese ASC and submitted to an inflammatory environment did not improve their insulin response when IL-17A was inhibited, although a trend towards a weak recovery was observed when the anti-IL17A mAb was present (Fig. 4). Thus, altogether, our results indicate that IL-17A does not play a major role in the impairment of adipogenesis nor defective insulin response which occurs when human ob-ASC/AD are submitted to an inflammatory environment.

Obesity not only leads to impaired adipogenesis, and/or defective insulin response, but also results in immune cell recruitment and low-grade inflammation within white AT. As IL-17A is known to exacerbate inflammation, using our co-culture model, we also investigated its contribution to inflammation onset. We submitted AD to the inflammatory CM harvested from PHA-activated ob-ASC/MNC co-cultures in the last two days of differentiation. This resulted in a strong increase of pro-inflammatory cytokine mRNA expression, such as *IL1B*, *IL6*, *IL8* in AD (Fig. 5). We then measured the contribution of IL-17A by neutralizing it, and observed an inhibition of *IL6* and *IL1B* gene expression, provided that the anti-IL17A mAb was added during inflammatory CM production (Fig. 5). Indeed, neutralizing IL-17A, once the inflammatory CM was added to AD, did not inhibit pro-inflammatory cytokine mRNA expression by AD, suggesting that a co-operation between AD and MNC is required to induce such an inhibitory effect (Fig. 5). One can suggest from our data that following interactions of MNC with ASC/AD, a vicious circle of inflammation is induced, where ob-ASC/AD activate IL-17A secretion, which in turn contributes to increase pro-inflammatory cytokine secretion by AD. Secukinumab, the anti-IL17 mAb used in this study, is the first anti-IL17 human mAb that has been approved for the treatment of inflammatory diseases, such as Psoriasis, Psoriatic Arthritis, Psoriatic Arthritis, or Ankylosing Spondylitis, when response to disease modifying anti-rheumatic drug (DMARD) therapy is inadequate. It is now indicated as a first-line biologic agent in Psoriasis [17]. Indeed Psoriasis is an inflammatory disease characterized by increased Th17, but also Th1 and Th22 cells [26,27]. This disease is frequently associated with a number of co-morbidities [28–30]. Among them, obesity and insulin resistance are the most important [31–35]. In addition, in obese and Psoriasis suffering patients, increased levels of serum leptin, resistin and pro-inflammatory cytokines are associated with a poorer response to biological therapy, whereas weight loss increases the response to biologic treatments [36–39]. Of interest is a study reporting that obese patients

suffering from Psoriasis and other comorbidities failed to respond to multiple biologic treatments, albeit Secukinumab [40]. As we have observed in the present study that blocking IL-17A with Secukinumab resulted in decreasing the inflammatory state of obese AD (Fig. 5), one can suggest that the beneficial effects of Secukinumab over the other biologics drugs mentioned in that study, could be related to the breaking of the vicious circle mediated by ob-ASC/Th17 cell interactions that leads to low grade pro-inflammatory cytokine secretion and propagation inside and outside AT.

In conclusion, the present study demonstrates that IL-17A does not play a major role in the impairment of adipogenesis nor insulin response in AT from obese subjects, but contributes to the induction of a vicious circle of inflammation, which may account for the low grade chronic inflammation observed in obese adipose tissues.

## 5. Ethic approval

Subcutaneous or visceral AT samples were isolated from residues of bariatric surgery of obese subjects (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>), with the approval of the Committee for the Protection of Human Subjects of the “Hospices Civils de Lyon” and with informed patient consent.

## Funding

Part of the study was financed by Novartis. This part concerned furnitures for experimental procedures, only. Analysis, interpretation of data and writing the manuscript were performed independently from Novartis funding.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

We wish to thank Novartis Company for having provided us with the Secukinumab mAb, and for having contributed to the funding of the Study (ref number: HCL:MM/FEH CT 69 HCL16 0293), together with INSERM and University Claude Bernard Lyon 1.

We wish to thank the “Comite de Recherche Academique” from Rhone Alpes Region, for having financed the PhD fellowship of Marwa Chehimi, and the EDISS Doctoral School in Lyon, for having financed the PhD fellowship of Julien Pestel, through a Government funding.

## Appendix A. Supplementary material

ASC and MSC were labeled for CD45, CD90, CD73 and CD105 markers. The expression of these surface molecules was measured by cytofluorometry. This figure is representative of 3 analyses. Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154865>.

## References

- [1] M. Ng, T. Fleming, M. Robinson, B. Thomson, N. Graetz, C. Margono, E.C. Mullany, S. Biryukov, C. Abbafati, S.F. Abera, J.P. Abraham, N.M.E. Abu-Rmeileh, T. Achoki, F.S. AlBuhairan, Z.A. Alemu, R. Alfonso, M.K. Ali, R. Ali, N.A. Guzman, W. Ammar, P. Anwar, A. Banerjee, S. Barquera, S. Basu, D.A. Bennett, Z. Bhutta, J. Blore, N. Cabral, I.C. Nonato, J.-C. Chang, R. Chowdhury, K.J. Courville, M.H. Criqui, D.K. Cundiff, K.C. Dabhadkar, L. Dandona, A. Davis, A. Dayama, S.D. Dharmaratne, E.L. Ding, A.M. Durrani, A. Esteghamati, F. Farzadfar, D.F.J. Fay, V.L. Feigin, A. Flaxman, M.H. Forouzanfar, A. Goto, M.A. Green, R. Gupta, N. Hafezi-Nejad, G.J. Hankey, H.C. Harewood, R. Havmoeller, S. Hay, L. Hernandez, A. Husseini, B.T. Idrisov, N. Ikeda, F. Islami, E. Jahangir, S.K. Jassal, S.H. Jee, M. Jeffreys, J.B. Jonas, E.K. Kabagambe, S.E.A.H. Khalifa, A.P. Kengne, Y.S. Khader, Y.-H. Khang, D. Kim, R.W. Kimokoti, J.M. Kinge, Y. Kokubo, S. Kosen, G. Kwan, T. Lai,

- M. Leinsalu, Y. Li, X. Liang, S. Liu, G. Logroscino, P.A. Lotufo, Y. Lu, J. Ma, N.K. Mainoo, G.A. Mensah, T.R. Merriman, A.H. Mokdad, J. Moschandreas, M. Naghavi, A. Naheed, D. Nand, K.M.V. Narayan, E.L. Nelson, M.L. Neuhouser, M.I. Nisar, T. Ohkubo, S.O. Oti, A. Pedroza, D. Prabhakaran, N. Roy, U. Sampson, H. Seo, S.G. Sepanlou, K. Shibuya, R. Shiri, I. Shuiue, G.M. Singh, J.A. Singh, V. Skirbekk, N.J.C. Stapelberg, L. Sturua, B.L. Sykes, M. Tobias, B.X. Tran, L. Trasande, H. Toyoshima, S. van de Vijver, T.J. Vasankari, J.L. Veerman, G. Velasquez-Melendez, V.V. Vlassov, S.E. Vollset, T. Vos, C. Wang, X. Wang, E. Weiderpass, A. Werdecker, J.L. Wright, Y.C. Yang, H. Yatsuya, J. Yoon, S.-J. Yoon, Y. Zhao, M. Zhou, S. Zhu, A.D. Lopez, C.J.L. Murray, E. Gakidou, Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013, *Lancet* 384 (2014) 766–781, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8).
- [2] E.A. Finkelstein, O.A. Khavjou, H. Thompson, J.G. Trogon, L. Pan, B. Sherry, W. Dietz, Obesity and severe obesity forecasts through 2030, *Am. J. Prev. Med.* 42 (2012) 563–570, <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2011.10.026>.
- [3] M. Chehimi, H. Vidal, A. Eljaafari, Pathogenic role of IL-17-producing immune cells in obesity, and related inflammatory diseases, *J. Clin. Med.* 6 (2017), <https://doi.org/10.3390/jcm6070068>.
- [4] S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki, K. Eto, H. Yamashita, M. Ohsugi, M. Otsu, K. Hara, K. Ueki, S. Sugiura, K. Yoshimura, T. Kadowaki, R. Nagai, CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity, *Nat. Med.* 15 (2009) 914–920, <https://doi.org/10.1038/nm.1964>.
- [5] S.L. Gaffen, Structure and signalling in the IL-17 receptor family, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 556–567, <https://doi.org/10.1038/nri2586>.
- [6] X. Song, Y. Qian, The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling, *Cytokine* 62 (2013) 175–182, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.03.014>.
- [7] E. Fabbri, M. Cella, S.A. McCartney, A. Fuchs, N.A. Abumrad, T.A. Pietka, Z. Chen, B.N. Finck, D.H. Han, F. Magkos, C. Conte, D. Bradley, G. Fraterrigo, J.C. Eagon, B.W. Patterson, M. Colonna, S. Klein, Association between specific adipose tissue CD4+ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals, *Gastroenterology* 145 (366–374) (2013) e1–e3, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.010>.
- [8] M. Sumarac-Dumanovic, D. Stevanovic, A. Ljubic, J. Jorga, M. Simic, D. Stamenkovic-Pejkovic, V. Starcevic, V. Trajkovic, D. Micic, Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women, *Int. J. Obes. (Lond.)* 33 (2009) 151–156, <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.216>.
- [9] T. McLaughlin, L.-F. Liu, C. Lamendola, L. Shen, J. Morton, H. Rivas, D. Winer, L. Tolentino, O. Choi, H. Zhang, M. Hui Yen Chng, E. Engleman, T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 (2014) 2637–2643, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304636>.
- [10] C. Zeng, X. Shi, B. Zhang, H. Liu, L. Zhang, W. Ding, Y. Zhao, The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications, *J. Mol. Med.* 90 (2012) 175–186, <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0816-5>.
- [11] S. Winer, Y. Chan, G. Palster, D. Truong, H. Tsui, J. Bahrami, R. Dorfman, Y. Wang, J. Zielinski, F. Mastroradi, Y. Maezawa, D.J. Drucker, E. Engleman, D. Winer, H.-M. Dorsch, Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy, *Nat. Med.* 15 (2009) 921–929, <https://doi.org/10.1038/nm.2001>.
- [12] A. Bertola, T. Ciucci, D. Rousseau, V. Bourlier, C. Duffaut, S. Bonnafant, C. Blin-Wakkach, R. Anty, A. Iannelli, J. Gugenheim, A. Tran, A. Bouloumié, P. Gual, A. Wakkach, Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients, *Diabetes* 61 (2012) 2238–2247, <https://doi.org/10.2337/db11-1274>.
- [13] E. Dalmas, N. Venteclaf, C. Caer, C. Poitou, I. Cremer, J. Aron-Wisniewsky, S. Lacroix-Desmazes, J. Bayry, S.V. Kaveri, K. Clément, S. André, M. Guerre-Millo, T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes, *Diabetes* 63 (2014) 1966–1977, <https://doi.org/10.2337/db13-1511>.
- [14] Y. Tang, Z. Bian, L. Zhao, Y. Liu, S. Liang, Q. Wang, X. Han, Y. Peng, X. Chen, L. Shen, D. Qiu, Z. Li, X. Ma, Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease, *Clin. Exp. Immunol.* 166 (2011) 281–290, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04471.x>.
- [15] A. Eljaafari, M. Robert, M. Chehimi, S. Chanon, C. Durand, G. Vial, N. Bendridi, A.-M. Madec, E. Disse, M. Laville, J. Rieusset, E. Lefai, H. Vidal, L. Pirola, Adipose tissue-derived stem cells from obese subjects contribute to inflammation and reduced insulin response in AD through differential regulation of the Th1/Th17 balance and monocyte activation, *Diabetes* 64 (2015) 2477–2488, <https://doi.org/10.2337/db15-0162>.
- [16] M. Chehimi, M. Robert, M.E. Bechwaty, G. Vial, J. Rieusset, H. Vidal, L. Pirola, A. Eljaafari, AD, like their progenitors, contribute to inflammation of adipose tissues through promotion of Th-17 cells and activation of monocytes, in obese subjects, *Adipocyte* 5 (2016) 275–282, <https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1134402>.
- [17] C.H. Smith, Z.K. Jabbar-Lopez, Z.Z. Yiu, T. Bale, A.D. Burden, L.C. Coates, M. Cruickshank, T. Hadoke, E. MacMahon, R. Murphy, C. Nelson-Piercy, C.M. Owen, R. Parslew, E. Peleva, E. Pottinger, E.J. Samarasekera, J. Stoddart, C. Strudwick, V.A. Venning, R.B. Warren, L.S. Exton, M.F. Mohd Mustapa, British association of dermatologists guidelines for biologic therapy for psoriasis 2017, *Br. J. Dermatol.* 177 (2017) 628–636, <https://doi.org/10.1111/bjd.15665>.
- [18] P. Bourin, B.A. Bunnell, L. Casteilla, M. Dominici, A.J. Katz, K.L. March, H. Redl, J.P. Rubin, K. Yoshimura, J.M. Gimble, Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for adipose therapeutics and science (IFATS) and the International society for cellular therapy (ISCT), *Cytotherapy* 15 (2013) 641–648, <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>.
- [19] M. Ahmed, S.L. Gaffen, IL-17 inhibits adipogenesis in part via C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  and Krüppel-like factors, *Cytokine* 61 (2013) 898–905, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.12.007>.
- [20] L.A. Zúñiga, W.-J. Shen, B. Joyce-Shaikh, E.A. Pyatnova, A.G. Richards, C. Thom, S.M. Andrade, D.J. Cua, F.B. Kraemer, E.C. Butcher, IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity, *J. Immunol.* 185 (2010) 6947–6959, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001269>.
- [21] J.H. Shin, D.W. Shin, M. Noh, Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in AD, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 1835–1844, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.03.008>.
- [22] B. Osta, F. Lavocat, A. Eljaafari, P. Miossec, Effects of Interleukin-17A on osteogenic differentiation of isolated human mesenchymal stem cells, *Front. Immunol.* 5 (2014) 425, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00425>.
- [23] A. Eljaafari, M.-L. Tartelin, H. Aissaoui, G. Chevreil, B. Osta, F. Lavocat, P. Miossec, Bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal cells promote Th17 cell expansion and activation through caspase 1 activation: Contribution to the chronicity of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 64 (2012) 2147–2157, <https://doi.org/10.1002/art.34391>.
- [24] C. Caër, C. Rouault, T. Le Roy, C. Poitou, J. Aron-Wisniewsky, A. Torcivia, J.-C. Bichet, K. Clément, M. Guerre-Millo, S. André, Immune cell-derived cytokines contribute to obesity-related inflammation, fibrogenesis and metabolic deregulation in human adipose tissue, *Sci. Rep.* 7 (2017), <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02660-w>.
- [25] B. Gustafson, U. Smith, Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preAD, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 9507–9516, <https://doi.org/10.1074/jbc.M512077200>.
- [26] A. Michalak-Stoma, A. Pietrzak, J.C. Szepletowski, A. Zalewska-Janowska, T. Paszkowski, G. Chodorowska, Cytokine network in psoriasis revisited, *Eur. Cytokine Netw.* 22 (2011) 160–168, <https://doi.org/10.1684/ecm.2011.0294>.
- [27] P. Quaglino, M. Bergallo, R. Ponti, E. Barberio, S. Cicchelli, E. Buffa, A. Comessatti, C. Costa, M.E. Terlizzi, S. Astegiano, M. Novelli, R. Cavallo, M.G. Bernengo, Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response, *Dermatology (Basel)* 223 (2011) 57–67, <https://doi.org/10.1159/000330330>.
- [28] J. Takeshita, S. Grewal, S.M. Langan, N.N. Mehta, A. Ogdie, A.S. Van Voorhees, J.M. Gelfand, Psoriasis and comorbid diseases, *J. Am. Acad. Dermatol.* 76 (2017) 393–403, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.07.065>.
- [29] N. Al-Mutairi, S. Al-Farag, A. Al-Mutairi, M. Al-Shiltawy, Comorbidities associated with Psoriasis: an experience from the Middle East, *J. Dermatol.* 37 (2010) 146–155, <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2009.00777.x>.
- [30] A.S. Lønnerberg, L. Skov, Co-morbidity in Psoriasis: mechanisms and implications for treatment, *Expert Rev. Clin. Immunol.* 13 (2017) 27–34, <https://doi.org/10.1080/1744666X.2016.1213631>.
- [31] F. Bardazzi, R. Balestri, E. Baldi, A. Antonucci, S. De Tommaso, A. Patrizi, Correlation between BMI and PASI in patients affected by moderate to severe Psoriasis undergoing biological therapy, *Dermatol. Ther.* 23 (Suppl 1) (2010) S14–S19, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01281.x>.
- [32] Y.-H. Huang, L.-C. Yang, R.-Y. Hui, Y.-C. Chang, Y.-W. Yang, C.-H. Yang, Y.-H. Chen, W.-H. Chung, Y.-Z. Kuan, C.-S. Chiu, Relationships between obesity and the clinical severity of Psoriasis in Taiwan, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 24 (2010) 1035–1039, <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03573.x>.
- [33] A.R. Setty, G. Curhan, H.K. Choi, Obesity, waist circumference, weight change, and the risk of psoriasis in women: nurses' health study II, *Arch. Intern. Med.* 167 (2007) 1670–1675, <https://doi.org/10.1001/archinte.167.15.1670>.
- [34] M. Gyldenlove, H. Storgaard, J.J. Holst, T. Vilsbøll, F.K. Knop, L. Skov, Patients with psoriasis are insulin resistant, *J. Am. Acad. Dermatol.* 72 (2015) 599–605, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.01.004>.
- [35] S.L. Brenelli, A.M. Moraes, S. Monte-Alegre, O.M. Carvalho, M.J. Saad, Insulin resistance in psoriasis, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28 (1995) 297–301.
- [36] A. Kyriakou, A. Patsatsi, D. Sotiriadis, D.G. Goulis, Effects of treatment for psoriasis on circulating levels of leptin, adiponectin and resistin: a systematic review and meta-analysis, *Br. J. Dermatol.* 179 (2018) 273–281, <https://doi.org/10.1111/bjd.16437>.
- [37] L. Clark, M. Lebwohl, The effect of weight on the efficacy of biologic therapy in patients with psoriasis, *J. Am. Acad. Dermatol.* 58 (2008) 443–446, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.11.011>.
- [38] L. Puig, Obesity and Psoriasis: body weight and body mass index influence the response to biological treatment, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 25 (2011) 1007–1011, <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04065.x>.
- [39] S. Upala, A. Sanguankee, Effect of lifestyle weight loss intervention on disease severity in patients with Psoriasis: a systematic review and meta-analysis, *Int. J. Obes. (Lond.)* 39 (2015) 1197–1202, <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.64>.
- [40] C. Lasagni, L. Bigi, A. Conti, G. Pellacani, Successful therapy of plaque-type psoriasis with secukinumab in patients with multiple comorbidities treated with previous biologic therapies, *J. Dermatol. Treatment.* (2018) 1–12, <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1543843>.



## Article 2

**Les acides gras polyinsaturés de type oméga-3 inhibent la sécrétion d'IL-17A médiée par les cellules souches adipocytaires via une diminution de l'expression d'ICAM-1, au sein du tissu adipeux issu de sujets obèses.**

Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit IL-17A Secretion through decreased ICAM-1 Expression in T Cells Co-Cultured with Adipose-Derived Stem Cells harvested from Adipose Tissues of Obese Subjects.

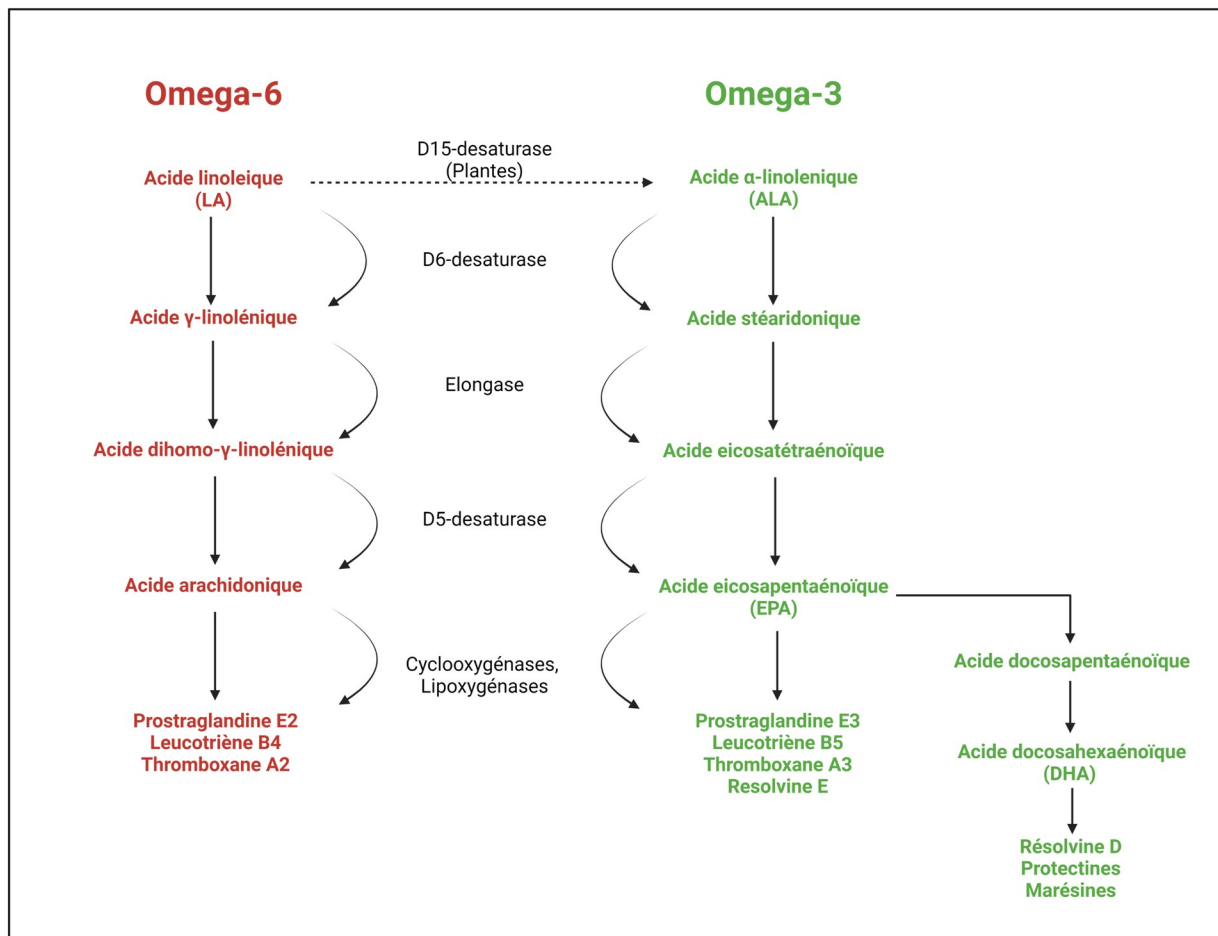
*Marwa Chehimi, Robert Ward, **Julien Pestel**, Maud Robert, Sandra Pesenti, Nadia Bendridi, Marie-Caroline Michalski, Martine Laville, Hubert Vidal, Assia Eljaafari.*

Molecular nutrition and food research, 2019.

## **Les OMEGA-3 régulateurs de l'inflammation du tissu adipeux durant l'obésité**

### Structure et métabolisme des $\omega$ -3 et $\omega$ -6

Les acides gras (AG) peuvent être classifiés selon deux méthodes, en fonction de leur nombre de doubles liaisons dans leur chaîne carbonée ou en fonction de la longueur de cette dernière. Ainsi, il existe des AG saturés (sans doubles liaisons), des AG monoinsaturés (1 double liaison) et des acides gras polyinsaturés (AGPI, entre 2 à 6 doubles liaisons). Les AG peuvent également être classés selon leur longueur de chaîne et la position de la première double liaison en partant du groupement méthyle. Ainsi, la chaîne carbonée de l'acide  $\alpha$ -linoléique, C18:3n-3 (ALA), contient 18 carbones et 3 insaturations dont la première est située sur le troisième carbone (n-3 ou  $\omega$ -3). L'acide linoléique, C18:2n-6 (LA), contient 18 carbones également, mais seulement 2 insaturations situées à partir du carbone 6 (n-6 ou  $\omega$ -6) (Shahidi and Ambigaipalan, 2018). Ces deux AGPI, ALA et LA sont dits essentiels, puisqu'ils ne peuvent pas être synthétisés par le corps humain. A l'inverse, ils sont produits en grande quantité par les plantes à partir de l'acide oléique via l'action de la D12 désaturase, absente chez l'Homme. LA peut également être convertie en ALA via la D15 désaturase mais une fois de plus absente chez l'Homme (Lee et al., 2016). Les dérivés de l'ALA sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), à eux trois avec l'ALA, ils constituent les principaux AGPI  $\omega$ -3. La conversion d'EPA et de DHA à partir d'ALA est faible chez l'Homme, 5 à 10% pour l'EPA et moins de 1% pour la DHA (Y.-S. Huang et al., 2004). Cependant, il a été montré que les végétariens possèdent plus d'enzymes transformant l'ALA en EPA et DHA que les carnivores. Le ratio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 est primordial puisqu'en effet, les enzymes qui convertissent l'ALA et LA sont les mêmes. Une concentration trop importante d' $\omega$ -6 limite le métabolisme des  $\omega$ -3, et donc leur utilisation (Lee et al., 2016). Il est donc nécessaire d'adapter son alimentation pour avoir un apport suffisant en  $\omega$ -3.



**Figure 21 : Métabolisme de l'acide linoléique et l'acide  $\alpha$ -linoléique.**

## Catabolisme des $\omega$ -6 et des $\omega$ -3

LA est converti en acide arachidonique, un précurseur de molécules pro-inflammatoires. L'acide arachidonique et LA peuvent être stockés au niveau membranaire et être libérés dans le cytoplasme par l'action de la phospholipase A2 suite à un stimulus (par exemple par TLR4) (Norris and Dennis, 2012). Une fois dans le cytoplasme, l'acide arachidonique peut être converti en eicosanoïdes par les cyclooxygénases 1 et 2, les lipoxygénases et le cytochrome P450. Les eicosanoïdes regroupent les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes qui jouent de nombreux rôles dans la réponse immunitaire, l'inflammation ou encore le système vasculaire (Calder, 2020). Par exemple le PGE2 et le leucotriène B4 synthétisés à partir de l'acide arachidonique, augmentent la perméabilité vasculaire, la vasodilatation et le chimiotaxisme des cellules immunitaires (Crooks and Stockley, 1998). De façon intéressante, le PGE2 est impliqué dans l'immunomodulation des CSA.

La conversion de l'ALA en EPA et DHA a principalement lieu dans le foie mais elle se déroule également dans le cerveau, la rétine et les testicules (Agbaga et al., 2010; Sassa and Kihara, 2014). L'ALA en elle-même est surtout stockée dans le tissu adipeux sous forme de TG. Elle peut également être  $\beta$ -oxydée. D'ailleurs, il a été démontré que l'ALA a le taux de  $\beta$ -oxydation le plus élevé parmi les acides gras insaturés (Nettleton, 1991). Les dérivés de l'ALA (EPA et DHA) peuvent également être incorporés dans les membranes cellulaires. Comme les  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 peuvent être incorporés dans les membranes, une supplémentation en  $\omega$ -3 permet de diminuer le ratio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 au niveau membranaire, car une compétition entre  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 a lieu dans les membranes pour la synthèse des eicosanoïdes. En effet, les enzymes convertissant les  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 sont les mêmes (cyclooxygénases dont COX-2 et lipoxygénases). Les  $\omega$ -3 sont eux utilisés pour synthétiser des molécules anti-inflammatoires, tels que les résolvines D et E, les marésines et les protectines, qui sont collectivement appelées médiateurs pro-résolution spécialisés et qui agissent comme des agents anti-inflammatoires (Giacobbe et al., 2020). L'EPA est également à l'origine de la synthèse des prostaglandines E3, des thromboxanes A3 et des leucotriènes B5 induisant une réponse inflammatoire moins intense (Calder, 2020; Seya et al., 1988) (**Figure 21**), alors que les  $\omega$ -6 induisent la synthèse de PGE2, de leucotriène B4 et de thromboxane A2, connus pour être pro-inflammatoires. Ainsi, la diminution du ratio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 permet de faire basculer la balance vers la production d'eicosanoïdes plutôt anti-inflammatoires favorisant la résolution de l'inflammation.

**Poisson gras**



**Fruit à coque**



**Fruit de chia, de lin**



**Plantes (Epinards, Soja)**



**Huiles (Lin, Colza, Noix)**



**Figure 22 : Principales sources alimentaires en  $\omega$ -3 .**

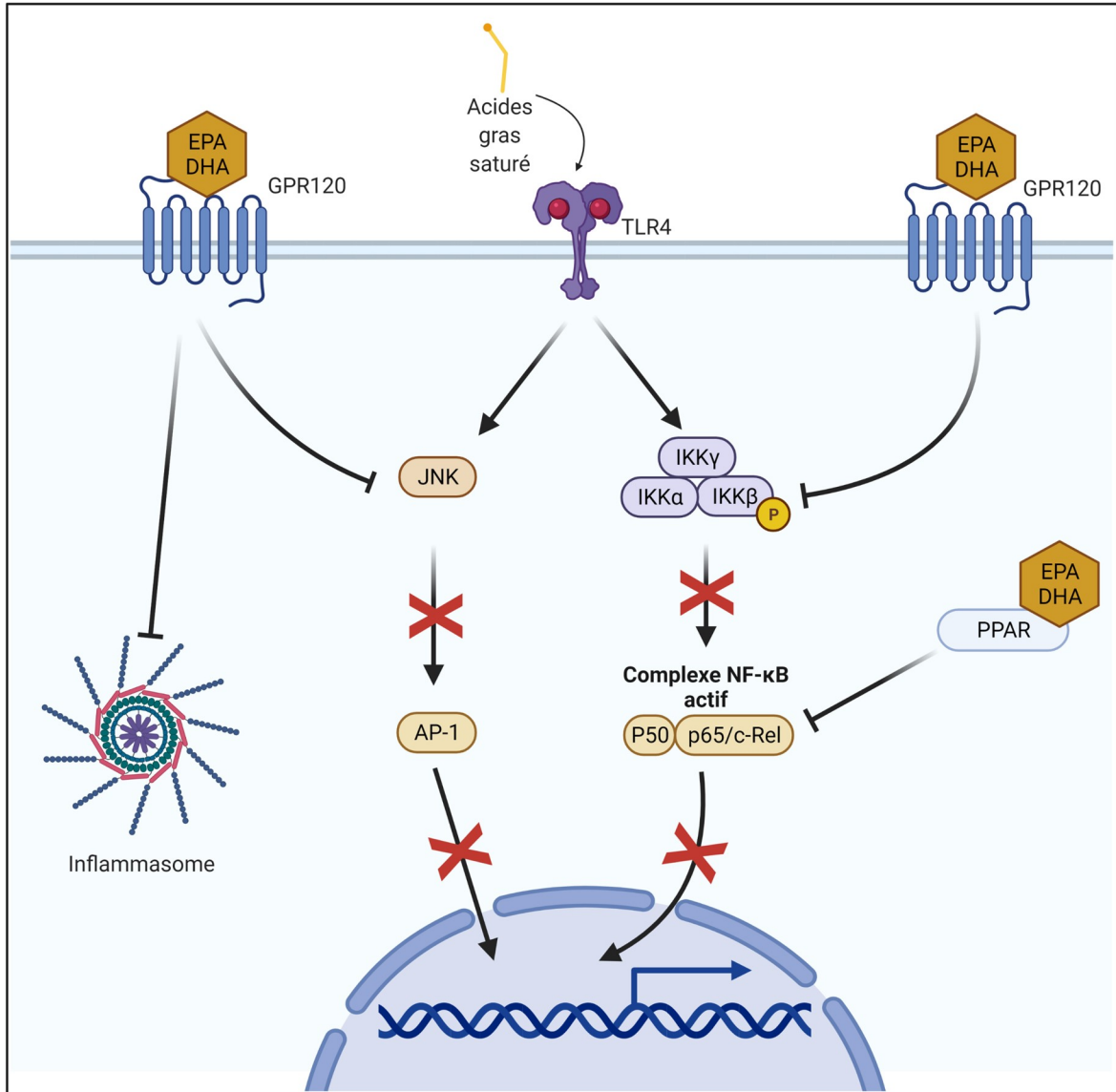
## Effets des omega-3 sur l'inflammation

Il a été montré que l'augmentation du ratio  $\omega$ -6 / $\omega$ -3 est associé à un risque accru de progression du syndrome métabolique et de l'athérosclérose (Burghardt et al., 2010; Wan et al., 2010). A l'inverse, l'augmentation de l'apport en  $\omega$ -3 réduit la mortalité due aux maladies cardiovasculaires, ainsi que la pression artérielle, les concentrations de TG et le risque thrombose (Casula et al., 2013; Chowdhury et al., 2014; Studer et al., 2005). Du fait des régimes occidentaux, les ratios  $\omega$ -6 / $\omega$ -3 varient entre 10:1 en Europe et 20:1 aux Etats-Unis alors que le rapport recommandé est de 3 à 5 :1 (Simopoulos, 2011). L'ALA est trouvé dans les plantes (Par exemple : graines de chia, de lin ou le basilic) alors que l'EPA et la DHA sont présents essentiellement dans les poissons gras (Par exemple : caviar, anchois, morue, saumon, maquereau) (Abedi and Sahari, 2014) (**Figure 22**). Les pays où la consommation de poisson est élevée présentent de meilleur ratio  $\omega$ -6 / $\omega$ -3 dans leur régime alimentaire, ainsi la population japonaise présente un ratio de 4 :1 (Simopoulos, 2008).

## Mécanismes d'action des $\omega$ -3

Les effets des  $\omega$ -3 sur toutes ces pathologies s'expliquent entre autres, par la capacité des  $\omega$ -3 à moduler l'inflammation. Par exemple, l'incubation de macrophages en présence de DHA et d'EPA permet d'inhiber la voie TLR4 et de diminuer l'expression de gènes inflammatoires tels que COX-2 et IL-1 $\beta$  (Lee et al., 2001; Norris and Dennis, 2012). Comme nous l'avons vu précédemment les acides gras saturés sont capables de stimuler le récepteur TLR4 et ainsi d'induire l'activation de la voie NF-KB. A l'inverse, l'EPA et la DHA peuvent limiter l'activation de cette voie (Lee et al., 2001).

L'EPA et la DHA peuvent également moduler la réponse inflammatoire en se liant au récepteur GPR120, un récepteur couplé aux protéines G, également connu sous le nom de récepteur 4 des acides gras libres (FFA4). L'activation du GPR120 par l'EPA ou le DHA conduit au recrutement de la  $\beta$ -arrestine 2 à la membrane plasmique. Le complexe GPR120/ $\beta$ -arrestine 2 est ensuite internalisé dans le compartiment cytoplasmique, il se lie à TAB1, la protéine de liaison de TAK1. Ce processus bloque l'interaction entre TAB1 et TAK1, en conséquence, entraîne une activation réduite de TAK1 et une diminution d'activation des voies de



**Figure 23 : Effet anti-inflammatoire des  $\omega$ -3 via GPR120 et PPAR.**

signalisation IKK- $\beta$ /NF- $\kappa$ B et JNK/AP-1 et de l'inflammasome. La diminution de l'activation de TAK-1 par le DHA conduit à une diminution d'expression des cibles des voies inflammatoires, tels que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 par des macrophages (Oh et al., 2010). Le récepteur GPR120 est fortement exprimé dans les macrophages et les adipocytes ce qui explique l'effet bénéfique d'un régime riche en  $\omega$ -3 chez des souris rendues obèses, du fait de la diminution de l'infiltration des macrophages et de l'inflammation du tissu adipeux (Oh et al., 2010).

Le récepteur TLR4, en plus d'induire l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, permet également l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, la stimulation de macrophages avec des  $\omega$ -3, (EPA et DHA), diminue l'activation de l'inflammasome NLRP3 et inhibe de fait, l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$ . En effet, l'activation de GPR120 et GPR40 induit la séquestration de NLRP3 par la  $\beta$ -arrestine-2, ce qui évite l'assemblage de l'inflammasome. Ceci se traduit *in vivo* par un effet des  $\omega$ -3 sur la prévention de la résistance à l'insuline induite par un régime hypercalorique, via l'inhibition l'activation de l'inflammasome NLRP3 et l'inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et de MCP-1 (Yan et al., 2013).

Un autre mécanisme par lequel les  $\omega$ -3 inhibent l'inflammation du tissu adipeux est lié à leur capacité à se lier aux isoformes de PPAR, notamment les isoformes PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  et PPAR- $\beta$ . Les différentes isoformes de PPAR forment des hétérodimères avec le récepteur X du rétinoïde (RXR) et se lient aux éléments de réponse des proliférateurs de peroxyosomes (PPRE) au niveau des promoteurs des gènes cibles impliqués dans le métabolisme des lipides, dans la différenciation adipocytaire et dans la réponse inflammatoire (Li and Glass, 2004; Zapata-Gonzalez et al., 2008). L'activation de PPAR- $\alpha$  et PPAR- $\gamma$  réduit l'expression des gènes activés par la voie de NF- $\kappa$ B. La DHA et l'EPA sont capables d'induire l'expression de PPAR- $\gamma$  et de fait, d'inhiber la voie NF- $\kappa$ B (Kong et al., 2010). De plus, l'EPA et le DHA sont capables d'interagir directement avec les isoformes de PPAR et, par conséquent, de moduler l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et la réponse inflammatoire (Martínez-Fernández et al., 2015) (**Figure 23**).

Les actions anti-inflammatoires de l'EPA et du DHA peuvent également être liées à une diminution de l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, entraînant une diminution du recrutement et de la dimérisation de TLR4 dans les radeaux lipidiques (Hwang et al., 2016). De plus, la diminution de l'activité NADPH oxydase diminue également la production de dérivés réactifs de l'oxygène, qui participent à l'activation de la voie TLR4.

Un autre mécanisme d'action des  $\omega$ -3 concerne la capacité d'incorporer de l'EPA et de la DHA aux dépens des  $\omega$ -6, au niveau de la membrane plasmique entraînant la destruction des radeaux lipidiques. En effet, les radeaux lipidiques sont des régions denses en cholestérol, en phospholipides contenant des acides gras saturés et en sphingolipides. Ils correspondent à des portions rigides de la membrane permettant l'ancrage de récepteurs et de molécules de signalisation. C'est notamment le cas, au niveau des radeaux lipidiques constituant la synapse immunologique. Les  $\omega$ -3 incorporés au niveau des radeaux lipidiques viennent ainsi les déstructurer. Ainsi la réponse lymphocytaire peut être inhibée par l'incorporation des  $\omega$ -3 au niveau des phospholipides membranaires, en limitant l'ancrage des protéines nécessaires à l'activation des lymphocytes (Calder, 2015). La déstructuration des radeaux lipidiques conduit également, à une diminution de la translocation de TLR4 et de MyD88 à la membrane. Cela diminue l'activation du récepteur TLR4 et, par conséquent, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Hwang et al., 2016). De plus, les  $\omega$ -3 diminuent l'ancrage à la membrane des récepteurs à l'IL-6 notamment au niveau des lymphocytes naïfs, ce qui a pour effet de diminuer leur polarisation en lymphocytes Th17 (Allen et al., 2014).

Enfin, les  $\omega$ -3 sont également capables d'inhiber la sécrétion d'IL-17A et la polarisation des Th17 dans différents modèles de pathologies inflammatoires tels que le psoriasis, la colite (Monk et al., 2012), l'uvéïte (Shoda et al., 2015) ou encore l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Kong et al., 2011).

### Effets cliniques des $\omega$ -3

Plusieurs études ont montré un rôle bénéfique des  $\omega$ -3 sur l'inflammation du tissu adipeux. La supplémentation en  $\omega$ -3 dans l'alimentation de femmes en surpoids ou en situation d'obésité a montré la capacité des  $\omega$ -3 à diminuer la concentration de la CRP et le nombre de leucocytes (Martínez-Fernández et al., 2015). De plus, la supplémentation en  $\omega$ -3 a diminué la concentration de résistine, une adipokine pro-inflammatoire associée au développement de la résistance à l'insuline (Wijetunge et al., 2019). A l'inverse, les  $\omega$ -3 sont capables d'induire une augmentation des concentrations d'adipokines anti-inflammatoires. Par exemple, une supplémentation en  $\omega$ -3 de 1,2 g/jour a augmenté l'adiponectine sérique chez des femmes en situation d'obésité ou en surpoids atteintes du syndrome des ovaires polykystiques, tout en

diminuant les concentration sérique de glucose, d'insuline et de cholestérol par rapport au placebo (Mohammadi et al., 2012). Une autre étude au cours de laquelle des sujets obèses ont reçu une supplémentation en EPA/DHA a montré une baisse de l'inflammation du tissu adipeux. En effet, les auteurs ont montré une diminution du MCP-1, de CCL-2, de l'IL-6 et une augmentation de l'adiponectine dans le TAsc de ces sujets (Itariu et al., 2012). Enfin, une autre étude a montré une diminution de l'inflammation du TAsc chez les femmes enceintes en état d'obésité, avec une diminution de l'expression de l'IL-6, de l'IL-8, du TNF $\alpha$  et de TLR4 (Haghiac et al., 2015). Plusieurs études ont également mis en évidence l'effet protecteur des  $\omega$ -3 vis-à-vis des pathologies cardiovasculaires. En effet, des métaanalyses ont montré que l'EPA et la DHA sont capables de diminuer la concentration en triglycérides plasmatiques, ainsi que la pression artérielle systolique et diastolique (AbuMweis et al., 2018; Miller et al., 2014) mais également la fréquence cardiaque (Hidayat et al., 2018). De plus, la supplémentation en  $\omega$ -3 induit une diminution de l'agrégation plaquettaire et des triglycérides plasmatiques (Gao et al., 2013; Hartweg et al., 2009).

Les  $\omega$ -3 ont également montré un effet dans le traitement contre le cancer. Les  $\omega$ -3 réduisent la croissance d'un certain nombre de types cellulaires issus de cancer, notamment prostatique, pulmonaire, et mammaire (Sf et al., 2015). De plus, les  $\omega$ -3 permettent d'augmenter l'efficacité de nombreuses chimiothérapies. Par exemple, une supplémentation de 1.8 g de DHA durant la chimiothérapie de femmes atteintes de cancer du sein a permis d'augmenter de 8 mois la survie de ces patientes. Les auteurs supposent que l'incorporation d' $\omega$ -3 dans les membranes des cellules cancéreuses participe à sensibiliser les cellules à la chimiothérapie (Bougnoux et al., 2009). Une étude japonaise en double aveugle concernant les cancers colorectaux a démontré qu'une supplémentation en EPA (2,7 g par jour) est capable d'inhiber le développement de cryptes colorectales aberrantes comparé au placebo (Higurashi et al., 2012).

Enfin, l'effet clinique des  $\omega$ -3 le plus fréquent est la diminution de l'inflammation chronique. En effet, une métaanalyse a évalué l'effet des  $\omega$ -3 chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques auto-immunes ou non. Il a été observé que la supplémentation en  $\omega$ -3 induit une diminution significative de la CRP, de l'IL-6 et du TNF $\alpha$  circulant. De plus, une corrélation inverse entre la durée de la supplémentation et les concentrations de ces cytokines a été observée, soulignant l'intérêt d'une consommation à long terme des  $\omega$ -3 (Li et al., 2014). Une autre métaanalyse a démontré que les  $\omega$ -3 induisent une

diminution de la concentration circulante de thromboxane B2 chez les patients à risque élevé de pathologies cardiovasculaires ainsi qu'une diminution de la concentration en leucotriène B4 chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Gioxari et al., 2018).

## B. Résumé de l'article :

Notre équipe a précédemment démontré le rôle des CSA issues du tissu adipeux de patients obèses dans la polarisation des lymphocytes Th17, via l'utilisation d'un modèle de co-culture de CSAob (cellules souches adipocytaires issues d'individus en état d'obésité) et de CMN (cellules mononuclées du sang) activées par la PHA (phytohéماغلوتينine A). Du fait du rôle anti-inflammatoire des  $\omega$ -3 et de leur capacité à inhiber la polarisation des lymphocytes Th17 dans différents modèles de pathologies inflammatoires chroniques (psoriasis, entérocolite, encéphalomyélite auto-immune), nous avons testé s'ils étaient capables d'inhiber la polarisation des lymphocytes Th17 médiée par les CSAob.

**- L'ALA ainsi que l'EPA et la DHA inhibent la sécrétion d'IL-17A médiée par les CSA, de façon dose dépendante.** Comme précédemment démontré, la co-culture de CSAob-CMN activée par la PHA induit une augmentation de la sécrétion d'IL-17A ainsi que d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6. L'ajout d'ALA lors de ces co-cultures a permis d'observer une diminution de la sécrétion d'IL-17A de façon dose dépendante. Cette inhibition n'est pas propre à l'ALA puisque la présence d'EPA et de DHA a donné le même effet. De plus, l'effet inhibiteur des  $\omega$ -3 est spécifique à l'IL-17A puisqu'ils n'affectent pas la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6, qui sont également augmentés dans notre modèle, mais sécrétés par les monocytes ou les CSA.

**- L'inhibition de la sécrétion d'IL-17A par l'ALA est associée à une inhibition de STAT3.** Comme nous l'avons vu dans le chapitre concernant les lymphocytes Th17, STAT3 est impliqué dans la polarisation vers la voie Th17. Nous avons pu montrer que l'ajout d'ALA induit une inhibition de la phosphorylation de STAT3, et donc de son activité.

**- L'ALA inhibe l'expression de marqueurs pro-inflammatoires.** Nous avons ensuite mesuré l'expression de COX-2 et de TLR4 en présence d'ALA car ces deux molécules ont été impliquées par d'autres auteurs dans les mécanismes d'action de l'ALA. Nous avons ainsi, mis en évidence que les  $\omega$ -3 dans notre modèle inhibent l'expression de COX-2 et de TLR4. Par

ailleurs, l'utilisation d'un peptide inhibiteur de TLR4 (VIPER) a permis de réduire fortement la sécrétion d'IL-17A par rapport au peptide contrôle (CP7). Cela nous a permis de valider l'implication de TLR4 dans l'activation de la sécrétion d'IL-17A médiée par les CSA et l'inhibition de cet effet par les  $\omega$ -3 (lié à une diminution d'expression de TLR4).

**- L'ALA inhibe l'expression d'ICAM-1 et donc les interactions entre CSA et CMN et entre lymphocytes et monocytes.** L'ALA est connue pour s'incorporer dans les membranes cellulaires et inhiber la formation des synapses intercellulaires (radeaux lipidiques). De ce fait, ayant précédemment démontré que la sécrétion d'IL-17A dans notre modèle implique ICAM-1, une molécule facilitant les contacts intercellulaires entre lymphocytes et monocytes et/ou CSA, nous avons analysé l'effet de l'ALA sur l'expression d'ICAM-1. Nous avons montré que l'ALA inhibe l'expression d'ICAM-1 et diminue les interactions cellulaires induites par la PHA. De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant ICAM-1 a permis de démontrer son implication dans la sécrétion d'IL-17.

**- L'ALA inhibe la sécrétion d'IL-17A médiée par les adipocytes.** Notre équipe a précédemment mis en évidence que les adipocytes différenciés à partir de CSA de sujets obèses sont capables eux aussi de polariser les lymphocytes Th17. Ainsi, nous avons montré ici, que l'ALA est également capable d'inhiber la polarisation des Th17 par les adipocytes renforçant le rôle important des  $\omega$ -3 dans la prévention de l'inflammation au niveau du tissu adipeux.

En conclusion, cette étude a démontré que l'ALA inhibe la polarisation des lymphocytes Th17 sans impacter la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6. Cela suggère un effet préférentiel des  $\omega$ -3 sur les lymphocytes T plutôt que sur les monocytes. Par ailleurs l'incubation de CMN seules avec de l'ALA induit une inhibition de la sécrétion d'IFN $\gamma$  sécrété par les lymphocytes mais pas de TNF $\alpha$ , essentiellement sécrété par les macrophages dans ce modèle. Confirmant ces résultats, Monk et son équipe, en utilisant un modèle de lymphocytes T CD8+ co-cultivés avec des adipocytes et activés par des anticorps anti-CD3/CD28, ont montré que l'huile de poisson (riche en  $\omega$ -3) n'induisait pas d'inhibition de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF $\alpha$  (Monk et al., 2015). Les anticorps anti-CD3/CD28 activent spécifiquement les lymphocytes. Dans notre modèle, la PHA active elle aussi spécifiquement les lymphocytes T, ce qui pourrait expliquer l'inhibition, des lymphocytes T, par les  $\omega$ -3.

Nous avons ensuite démontré que les  $\omega$ -3 inhibent la sécrétion d'IL-17A, via la diminution d'expression d'ICAM-1. LFA-1 est le ligand d'ICAM-1, c'est une  $\beta$ 2 intégrine qui joue un rôle important dans les interactions intercellulaires (Rothlein et al., 1986). Etant donné que LFA-1 est exprimé par leucocytes, nos résultats suggèrent que l'inhibition d'ICAM-1 au niveau des CSA et des monocytes pourrait réduire la capacité des monocytes et des macrophages à interagir avec les lymphocytes T. Appuyant cette hypothèse, l'incubation des CMN activées par la PHA avec l'ALA diminue la formation d'agrégats cellulaires. D'ailleurs, de manière intéressante, il a été démontré que les niveaux circulants d'ICAM-1 sont réduits par l'ALA chez des sujets en état d'obésité, induisant par la suite une amélioration de la pression artérielle, de l'inflammation et de la dysfonction endothéliale (Egert et al., 2014). Ce nouveau mécanisme pourrait contribuer à expliquer les effets bénéfiques des  $\omega$ -3 dans les pathologies inflammatoires liées à l'IL-17A et, associées à l'obésité.

Nous avons également observé dans notre modèle une inhibition de l'expression de TLR4 et de COX-2 par l'ALA. TLR4 est un récepteur membranaire dont la voie de transduction conduit à l'activation de la COX-2. Il a déjà été rapporté que les  $\omega$ -3 diminuent l'expression de TLR4, ce qui confirme nos résultats (H.-Q. Liu et al., 2013; Norris and Dennis, 2012). De plus, en utilisant un peptide inhibiteur de TLR4 nous avons démontré son implication dans la sécrétion d'IL-17A. D'autres études, ont démontré que TLR4 était nécessaire à la sécrétion d'IL-17A et à l'inflammation médiée par cette cytokine. De fait, il a été démontré que les souris déficientes en TLR4 présentent une arthrite moins sévère, et des niveaux de sécrétion d'IL-17A inférieurs à ceux des souris sauvages (Abdollahi-Roodsaz et al., 2008). Le déficit en TLR4 entraîne une diminution de l'infiltration des neutrophiles, de la production de cytokines pro-inflammatoires et du phénotype inflammatoire (Tang et al., 2010). Puisque les  $\omega$ -3 soulagent les pathologies inflammatoires liées aux lymphocytes Th17, et puisque nous avons démontré qu'ils inhibent l'expression de TLR4 et la sécrétion d'IL-17A qui en découle, nous pouvons suggérer que les  $\omega$ -3 pourraient jouer un rôle dans le soulagement des maladies inflammatoires médiées par les lymphocytes Th17, en inhibant l'expression de TLR4.

# Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit IL-17A Secretion through Decreased ICAM-1 Expression in T Cells Co-Cultured with Adipose-Derived Stem Cells Harvested from Adipose Tissues of Obese Subjects

Marwa Chehimi, Robert Ward, Julien Pestel, Maud Robert, Sandra Pesenti, Nadia Bendridi, Marie-Caroline Michalski, Martine Laville, Hubert Vidal, and Assia Eljaafari\*

**Scope:** Obese adipose tissue (AT) is infiltrated by inflammatory immune cells including IL-17A-producing-T (Th17) cells. It has been previously demonstrated that adipose-derived stem cells from obese (ob-ASCs), but not lean AT promote Th17 cells. Because n-3 PUFAs are known to inhibit obese AT inflammation, it is tested here whether they could inhibit ob-ASC-mediated IL-17A secretion.

**Methods and Results:** The n-3 PUFA precursor, alpha-linolenic acid (ALA), or its derivatives, eicosapentaenoic, or docosahexaenoic acid, is added to co-cultures of human ob-ASCs and mononuclear cells (MNCs). All three inhibited IL-17A, but not IL-1 $\beta$ , IL-6, nor TNF $\alpha$  secretion. As a control, palmitic acid (PA), a saturated fatty acid, did not inhibit IL-17A secretion. ALA also inhibited IL-17A secretion mediated by adipocytes differentiated from ob-ASCs. Toll-like-receptor 4 is shown to be involved in ob-ASC-mediated-IL-17A secretion, and to be inhibited by ALA, together with Cyclo-Oxygenase-2 and Signal-Transducer-and-Activator-of-transcription-3. In addition, ALA down-regulated Intercellular-Adhesion-Molecule-1 (ICAM-1) expression in both monocytes and ASCs, which resulted in decreased interactions between ob-ASCs and MNCs, and inhibition of IL-17A secretion.

**Conclusion:** It is demonstrated herein that ALA inhibits Th17 cell promotion, through decreased ICAM-1 expression in both ob-ASCs and monocytes. This novel mechanism may contribute to explain the beneficial effects of n-3 PUFA in IL-17A-related inflammatory pathologies.

## 1. Introduction

Increased incidence of obesity and its subsequent comorbidities are a worldwide health problem. White adipose tissue (AT) is now recognized as an active metabolic tissue and endocrine organ.<sup>[1]</sup> During the development of obesity, obese AT is sub-

jected to infiltration and accumulation of inflammatory immune cells, which together with adipose cells contribute to the development of an inflammatory environment leading to a state of insulin resistance.<sup>[2,3]</sup> Secretion of inflammatory cytokines and adipokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, leptin, and downregulation of insulin-sensitizing adipokines, such as adiponectin and IL-10,

Dr. M. Chehimi, J. Pestel, S. Pesenti, N. Bendridi, Dr. M.-C. Michalski, Prof. M. Laville, Dr. H. Vidal, Dr. A. Eljaafari  
INSERM U 1060-CarMen  
University Claude Bernard Lyon I  
165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre Bénite, France  
E-mail: assia.eljaafari@univ-lyon1.fr

Prof. R. Ward  
Department of Nutrition  
Dietetics, and Food Sciences  
Utah State University  
Old Main Hill, Logan, Utah 84322, USA

Prof. M. Robert  
Department of Surgery in Gastro-enterology  
Edouard Herriot Hospital  
1 place d'Arsonval, 69003 Lyon, France

Prof. M. Laville  
Department of Nutrition  
South Lyon Hospital  
Hospices Civils de Lyon  
165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre Bénite, France

Dr. A. Eljaafari  
Research DO-IT Team  
Hospices Civils de Lyon  
Faculte de Medecine Lyon Sud, Inserm U1060-CarMen  
165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre Bénite, France

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801148>

DOI: 10.1002/mnfr.201801148

are some of the players in this process.<sup>[2–4]</sup> Th17 cells are potent pro-inflammatory T cells, which are part of obese adipose tissue infiltrating cells.<sup>[5–8]</sup> We have previously reported that one of the mechanisms contributing to Th17 cell activation is dependent on their cross talk with adipose tissue-derived stem cells (ASCs) in obese AT (ob-ASC).<sup>[9]</sup> Indeed, in this model ob-ASCs, but not ASCs from lean AT, were responsible for Th17 promotion, through STAT-3 activation, and ICAM-1-mediated interactions. We have also demonstrated that adipocytes differentiated from ob-ASCs play a similar role in propagating inflammation among infiltrating immune cells.<sup>[10]</sup> At the metabolic level, obesity is associated with elevated serum levels of free fatty acids (FFA), mainly saturated fatty acids (SFA) which are known to enhance inflammatory signaling, predominantly through the Toll-Like-Receptor (TLR4) pathway.<sup>[11,12]</sup> Indeed, SFA serve as ligands for TLR4 resulting in activation of NF $\kappa$ B and secretion of pro-inflammatory cytokines in various tissues including AT.<sup>[13]</sup> Inversely, omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) are less present in the serum of obese individuals.<sup>[14]</sup> Moreover, among the PUFAs, the balance between n-6 and n-3 in obese individuals is skewed towards n-6 PUFA, with ratios reaching up to 20:1, as compared to a recommended ratio of 3 to 5:1.<sup>[15,16]</sup> The tissue balance between n-6 and n-3 PUFA which is influenced by diet, is important in the inflammatory response, as reviewed by Calder.<sup>[17]</sup> N-6 PUFAs are substrates for the biosynthesis of inflammatory mediators, such as prostaglandin E<sub>2</sub>, or leukotriene B<sub>4</sub>. Dietary alpha-linolenic acid may be elongated and desaturated to the long-chain n-3 PUFAs eicosapentanoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) which have been shown to inhibit inflammation.<sup>[18]</sup> Multiple mechanisms are involved in n-3 mediated inhibition of inflammation. For example, the cyclo-Oxygenase 2 (COX-2) enzyme, uses the n-6 PUFA, arachidonic acid, as a substrate to produce the inflammatory mediator, PGE<sub>2</sub>, while EPA is converted to the less inflammatory metabolite, PGE<sub>3</sub>.<sup>[19]</sup> Long-chain n-3 PUFAs decrease TNF $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  pro-inflammatory cytokine production from LPS-stimulated cells.<sup>[20]</sup> The reduction in cytokine molecule production by DHA and EPA appears to involve effects on NF- $\kappa$ B, and reduction in the signaling of TLR4, which may be due to the ability of the long-chain PUFAs to affect lipid membrane raft formation.<sup>[21]</sup> DHA and EPA may also affect NF- $\kappa$ B activation via upregulation of PPAR $\gamma$ .<sup>[22]</sup> Last, EPA and DHA also actively participate in the resolution of inflammation via conversion to metabolites such as resolvins, protectins, and maresins, also named specialized pro-resolving mediators (SPM).<sup>[23]</sup>

Interestingly, n-3 PUFAs have been recently shown to inhibit IL-17A secretion, and/or Th17 cell promotion in several pathological models, such as auto-immune uveitis, colitis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), or psoriasis.<sup>[24–28]</sup> However these studies either used EPA/DHA containing fish oil (FO), or genetic mice models able to synthesize n-3 PUFAs de novo. But, ALA, the precursor of EPA and DHA has never been tested for these effects. Therefore, using our co-culture model in which ob-ASCs promoted IL-17A secretion by T cells, we addressed herein whether ALA would inhibit this process. We demonstrate that ALA, as well as EPA and DHA, inhibit ASC-mediated IL-17A secretion, but do not alter the secretion of monocyte-derived pro-inflammatory cytokines known to be activated in this co-culture

model, such as IL-1 $\beta$  and IL-6. The decrease of ALA-mediated IL-17A secretion was associated with an inhibition of Signal-Transducer-and Activator-of-Transcription-3 (STAT3) activation, and decreased levels of COX-2 and TLR4 mRNA expressions. At the cellular level, ALA inhibited ICAM-1 expression in both monocytes and ASCs, resulting in the reduction of cell–cell interactions known to be required for Th17 cell activation.<sup>[9]</sup>

## 2. Experimental Section

### 2.1. Isolation and Expansion of ob-ASC

Subcutaneous or visceral AT samples were isolated from residues of bariatric surgery of five obese subjects (BMI > 30 kg m<sup>-2</sup>), with the approval of the Committee for the Protection of Human Subjects of the “Hospices Civils de Lyon” and with informed patient consent. AT samples (50–100 mg) were fragmented and incubated in 2 g L<sup>-1</sup> of collagenase type Ia solution (Sigma-Aldrich, C2674) dissolved in DMEM:F12 medium (50/50 v/v) (Invitrogen) for 40 min at 37 °C by mixing. Collagenase action was quenched by the addition of 1:1 v/v of DMEM:F-12 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS). The released stromal vascular fraction (SVF) was recovered by centrifugation (800 g for 7 min at 25 °C). Residual red blood cells were lysed by hypotonic shock and the ASC component of the SVF was selectively expanded in culture medium composed of DMEM:F-12 supplemented with 10% FCS, 2 mmol L<sup>-1</sup> L-glutamine, and 100 U mL<sup>-1</sup> penicillin–streptomycin. Half of the culture medium was changed every 2–3 days. ASCs were amplified by several passages in culture (3 to 4) and directly used for experiments or stored in liquid nitrogen. The pluripotent phenotype of ASCs was validated by differentiating ASCs into adipocytes or osteoblasts, depending on the differentiation medium used, as previously reported.<sup>[9]</sup> To ascertain ASC identity, staining with FITC or PE conjugated mouse anti-human cell surface markers (from BD, Becton Dickinson Biosciences, France) revealed a CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, and CD45<sup>-</sup> pattern as recommended by the French Cell Therapy Society<sup>[29]</sup> (Figure S1, Supporting Information).

### 2.2. Isolation of Blood Mononuclear Cells

Blood samples were obtained through the Blood Bank Center of Lyon (France), following institutionally approved guidelines. Blood mononuclear cells (MNCs) were extracted from healthy human peripheral blood by density gradient centrifugation (Ficoll–Paque, Miltenyl Biotec). MNCs were stored in liquid nitrogen prior to use.

### 2.3. Co-Culture Assays

Ob-ASCs were harvested and seeded in 96-well plates (20 000 cells per well) for 18–24 h. 100 000 MNCs were co-seeded for 48 h in the presence or absence of phytohemagglutinin (PHA), 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, (Sigma-Aldrich). ASC alone, MNC alone, or co-cultures, were treated with indicated doses of fatty acids (FA). After 48 h, supernatants were harvested and frozen.

**Table 1.** Primers for real-time PCR.

Gene name	5'-3' sequence	Amplicon size, bp	RefSeq number
TBP	F: TGGTGTGCACAGGAGCCAAG R: TTCACATCACAGCTCCCCAC	139	NM_003194
COX-2	R: TTGCGCCTTTTCAAGGATGG F: TCCTGCCCCACAGCAAAC	140	NM_000963
ICAM-1	R: CTGCAGACAGTGACCATCTA F: GACAATCCCTCTCGTCCAGT	307	NM_000201
IL-17RA	CCACAGTTGTTTGAGCACA GCATTCTGGGCAGGAAACA	194	NM_014339; NM_001289905
IL-8	F: TTCTGCAGCTCTGTGTGAAG R: ACAGAGCTCTCTCCATCAG	186	NM_000584
MCP-1	R: TCAGCCAGATGCAATCAATG F: ATGGTCTTGAAGATCACAGC	138	NM_002982
TLR4	F: CAACCAAGAACCTGGACCTG R: AGGTAGAGAGGTGGCTTAGG	155	NM_138554

#### 2.4. Reporting Dose and Administration Details

ALA (U-62A Nu-Chek prep), EPA (E2011 Sigma-Aldrich) or DHA (D2534), prior to activation with PHA, or PUFA were added to the co-cultures at 1, 50, or 100  $\mu\text{M}$ . Stock solutions were prepared in ethanol and further diluted at 1:250 in RPMI containing 2 % FA-free BSA, 2 mM L-glutamine, 100 U mL<sup>-1</sup> penicillin-streptomycin and 1 % sodium bicarbonate. Palmitic acid (PA) (P0500 Sigma-Aldrich) was directly diluted in the same culture medium at the concentration of 200  $\mu\text{M}$ . The concentrations used for ALA, EPA, DHA, and PA were similar to those classically reported for assays with mononuclear cells, and were not toxic for the cells, as mentioned in the main text. In some experiments, a TLR4 neutralizing peptide (VIPER), or its negative control (CP7) peptide (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Novus bio NBP2-26244) or ICAM-1 neutralizing antibody (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were added to co-cultures.

#### 2.5. Cytokine Secretion

IL-17A (#88-7176-88), IL-1 $\beta$  (#88-7261-88), and IL-6(#88-7066-88) secretion were measured by ELISA, using the corresponding antibodies (e-Biosciences).

#### 2.6. Western-Blot Analysis

3 h following activation of co-cultures with PHA, cells were harvested, proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were then immunoblotted with the appropriate antibodies to detect phospho-STAT3-Ser727 (no. 9134) and total STAT3 (no. 9139), from Cell Signaling Technologies. Antibody binding was then detected by using HRP-conjugated secondary antibodies and Luminata Forte western HRP substrates (Merck). Immunoblots were visualized by a chemiluminescence imaging system.

#### 2.7. mRNA Measurements

Total RNA was extracted from co-cultures using the Tri Isolation Reagent (Roche, Meylan, France). RNAs were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . cDNA was synthesized from 250 ng of total RNA using the PrimescriptRT reverse transcription kit (Takara, Dalian, Japan) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed in duplicate on a Rotor-gene Real-time PCR System, using the Absolute qPCR SYBR Green Mix (ABgene, Ilkirch, France). Quantitative data were defined by threshold cycle (Ct) normalized for the housekeeping gene TATA Box Binding Protein (TBP). Primer sequences are reported in Table 1.

#### 2.8. Flow Cytometry

Prior to staining, cells were washed in PBS/2% FCS. Thirty minutes of incubation with fluorescent ICAM-1, CD14, CD105 antibodies were followed by several washes in PBS/2% FCS. Cells were analyzed on a LSRII flow cytometer (Becton Dickinson), and the DIVA software.

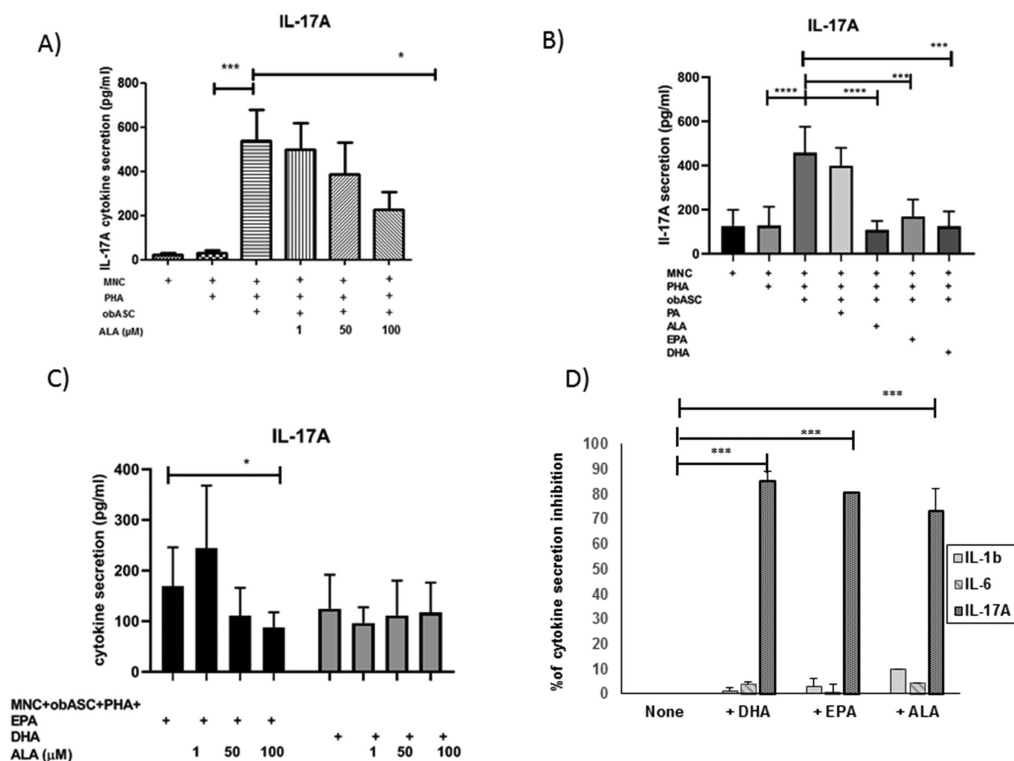
#### 2.9. Statistical Analysis

The one-way ANOVA test was used followed by post hoc Bonferroni multiple comparison tests. Differences were considered statistically significant when  $p$  was  $< 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. ALA, like EPA or DHA, Inhibits ob-ASC-Mediated IL-17A Secretion, in a Dose-Dependent Manner

We have previously developed a co-culture model mimicking immune cell infiltration in obese adipose tissue (ob-AT), and leading to Th17 and monocyte cell activation.<sup>[9]</sup> In order to



**Figure 1.** ALA, like EPA and DHA, inhibits ob-ASC-mediated IL-17A secretion, in a dose-dependent manner. MNCs from healthy donors were activated (+) or not with PHA, and co-cultivated with ASCs derived from obese donors at the ratio of 5:1 MNCs: ASCs. Co-cultures were treated with or without increasing concentrations of ALA. 48 h later, supernatants were harvested and cytokine secretion was analyzed by A) ELISA for IL-17A. B) EPA, DHA, or PA were used instead of ALA. C) Graduated doses of ALA were added to EPA or DHA (100 μM) in co-culture assays D) IL-17A, IL-1β, and IL-6 secretions were measured by ELISA, and results are shown as percentage of cytokine secretion inhibition. Error bars represent standard deviations (SD) from  $n \geq 3$  independent experiments in triplicates. \*, \*\*\*, represent  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ , as obtained by the one-way ANOVA followed by Bonferroni comparison tests.

evaluate the effects of n-3 PUFAs on Th17 activation, co-cultures of human ob-ASCs and MNCs were activated with PHA in the presence of increasing doses of ALA for 48 h. IL-17A, IL-1β, and IL-6 secretions were measured by ELISA. As expected, ob-ASCs induced a strong increase of IL-17A secretion which was inhibited by ALA in a dose-dependent manner, with a statistically significant inhibition obtained at 100 μM ( $p < 0.05$ ) (Figure 1A). Since EPA and DHA long-chain n-3 PUFAs are known to exert anti-inflammatory effects,<sup>[30]</sup> we investigated whether inhibition of IL-17A secretion was specific for ALA treatment, or could be induced by either of its two derivatives. As control, PA, a saturated fatty acid was used. As shown in Figure 1B, both EPA and DHA, inhibited ob-ASC-mediated IL-17A secretion, but PA, a saturated fatty acid, did not.

To test whether a potentiating effect on IL-17A inhibition could be observed in the presence of ALA, and/or EPA, or DHA, graduated doses of ALA were added to EPA or DHA in the co-culture model. Results showed a potentiation of EPA-mediated inhibitory effect in the presence of 100 μM ALA. However, no potentiating effect was observed with DHA (Figure 1C). Finally, the inhibitory effect of ALA, EPA, or DHA, was selective for IL-17A, as n-3 PUFA treatment did not affect IL-1β nor IL-6 secretion (Figure 1D).

Collectively, these results indicate that ALA and its long-chain derivatives selectively inhibit ASC-mediated IL-

17A secretion, and that ALA potentiates EPA inhibitory effects.

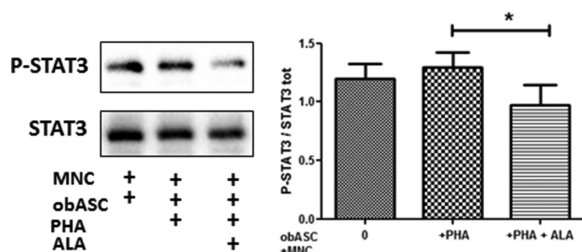
### 3.2. ALA-Mediated Inhibition of IL-17A Secretion is Associated with STAT3 Inhibition

STAT3 is a master transcription factor involved in IL-17A secretion<sup>[31]</sup> and has been shown to contribute to IL-17A secretion in an ASC–MNC co-culture model.<sup>[9]</sup> Phosphorylated-STAT3 is the active and functional form of STAT3. Thus, to investigate whether STAT3 could contribute to the anti-inflammatory effects of ALA, STAT3 phosphorylation was measured in the presence or absence of ALA. As shown in Figure 2, ALA significantly reduced STAT3 phosphorylation, as compared to the untreated cells.

Thus, these results indicate that ALA suppresses ob-ASC-mediated Th17 activation and inhibits STAT3 activity.

### 3.3. ALA Inhibits mRNA Expression of Inflammatory Markers, such as COX-2 and TLR4

COX-2 is an inflammatory enzyme known to be activated by n-6 and inhibited by n-3 PUFA.<sup>[19]</sup> Moreover, COX-2 has been shown

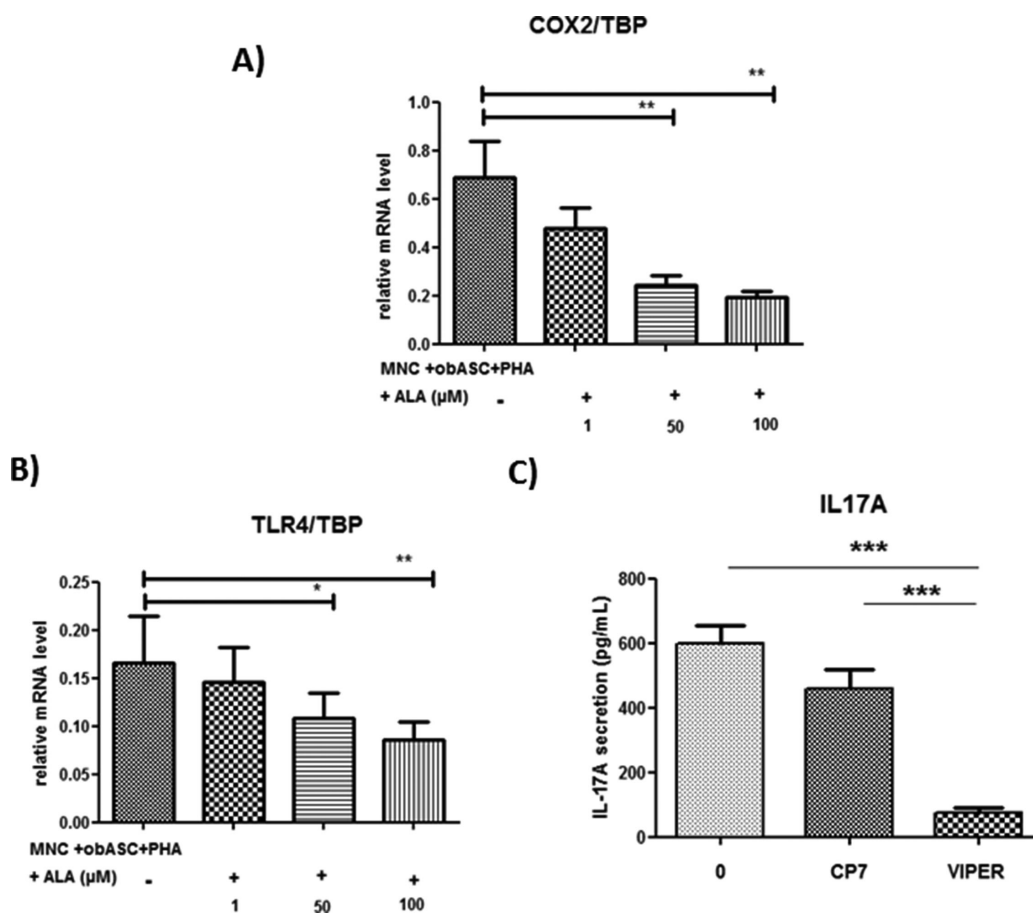


**Figure 2.** ALA-mediated inhibition of IL-17A secretion is associated with STAT3 inhibition. Co-cultures activated or not with PHA were treated with or without ALA (100  $\mu$ M) for 3 h. Western-blot analysis of P-STAT3 and total STAT3 were performed on equally loaded gels (left panel) in independent experiments. Quantification of P-STAT3 normalized on total STAT3 levels (right panel). \* represents  $p < 0.05$ , as obtained by the one-way ANOVA followed by Bonferroni comparison tests, using as control the MNC+ASC+PHA condition.

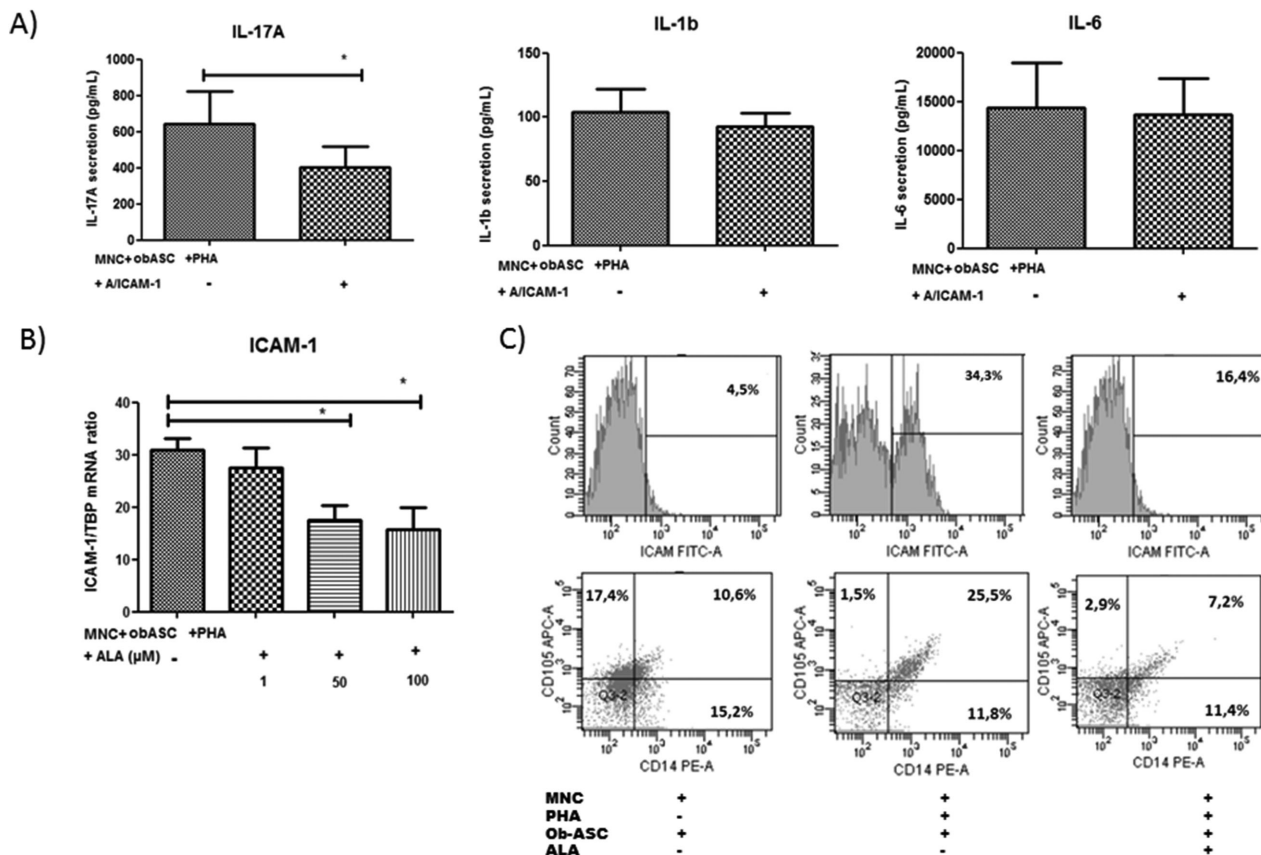
to participate in the induction of IL-17A secretion through induction of PGE2 synthesis.<sup>[32,33]</sup> Therefore, we measured COX-2 gene expression levels in the ASC–MNC co-culture model. Results showed that COX-2 mRNA expression was inhibited in a

dose-dependent manner in ALA treated co-cultures, with statistically significant results obtained with 50  $\mu$ M of ALA, or more ( $p < 0.01$ ) (Figure 3A).

To further elucidate the mechanisms involved in ALA-mediated inhibition of IL-17A secretion, we investigated the involvement of TLR4 signaling in this model, since fish-oil supplementation which provides EPA and DHA, is known to suppress TLR4 signaling leading to COX-2 activation and reduction of inflammation.<sup>[34,35]</sup> We thus measured the gene expression levels of TLR4 following activation with phytohemagglutinin A (PHA) in the ASC–MNC co-culture model, and observed that it was significantly downregulated by ALA in a dose-dependent manner (Figure 3B). To assess the implication of TLR4 in ob-ASC-mediated IL-17A secretion, we used VIPER, a peptide known to inhibit TLR4 signaling by directly targeting the MyD88 adaptor-like and TRIF-related adaptor molecules.<sup>[36]</sup> As shown in Figure 3C, IL-17A secretion was markedly inhibited in the VIPER- treated co-cultures, as compared to those treated with the CP7 negative control peptide. Therefore, these results suggest that ALA inhibits IL-17A secretion through a mechanism linked to TLR4 signaling.



**Figure 3.** ALA inhibits mRNA expression of inflammatory markers, such as COX-2 and TLR-4. PHA activated co-cultures by were treated or not with graded concentrations of ALA (1, 50, 100  $\mu$ M). A,B) 24 h later, cells mRNA was extracted for qPCR quantification of COX-2, and TLR4 gene expression. Gene expression was normalized to the TBP housekeeping gene. C) Co-cultures of cells activated by PHA were treated or not with a TLR4 inhibitory peptide (VIPER), or its control peptide (CP7). Supernatants were harvested and cytokine secretion was analyzed by ELISA for IL-17A secretion. Error bars represent standard deviations from  $n \geq 3$  independent experiments in triplicates. \*, \*\*, \*\*\*, represent  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , as obtained by the one-way ANOVA followed by Bonferroni comparison tests.



**Figure 4.** ALA inhibits ICAM-1 expression on both ASCs and monocytes, and decreases the formation of cell aggregates between monocytes and ASCs. A) Co-cultures of MNC+ASC activated by PHA were treated or not with anti-ICAM-1 neutralizing antibody ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). IL-17A, IL-1 $\beta$ , and IL-6 secretions were measured by ELISA, after 48 h. B) Graduated concentrations of ALA (1, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) were added to PHA-activated co-cultures. 24 h later, cells were subjected to RNA extraction for ICAM-1 mRNA quantification. Gene expression was normalized to the TBP housekeeping gene. C) Representative flow cytometry plots of MNC+ob-ASC treated or not with PHA plus or minus ALA. The percentage of stained cells for ICAM-1, CD105, or CD14 are indicated in the top of each histogram, or dot plot. Error bars represent standard deviations from  $n = 3$  independent experiments. \* represent  $p < 0.05$ , as obtained by the one-way ANOVA followed by Bonferroni comparison tests, using as control the MNC+ASC+PHA condition.

### 3.4. ALA Inhibits ICAM-1 Expression on both ASCs and Monocytes, and Decreases the Formation of Cell Aggregates between Monocytes and ASCs

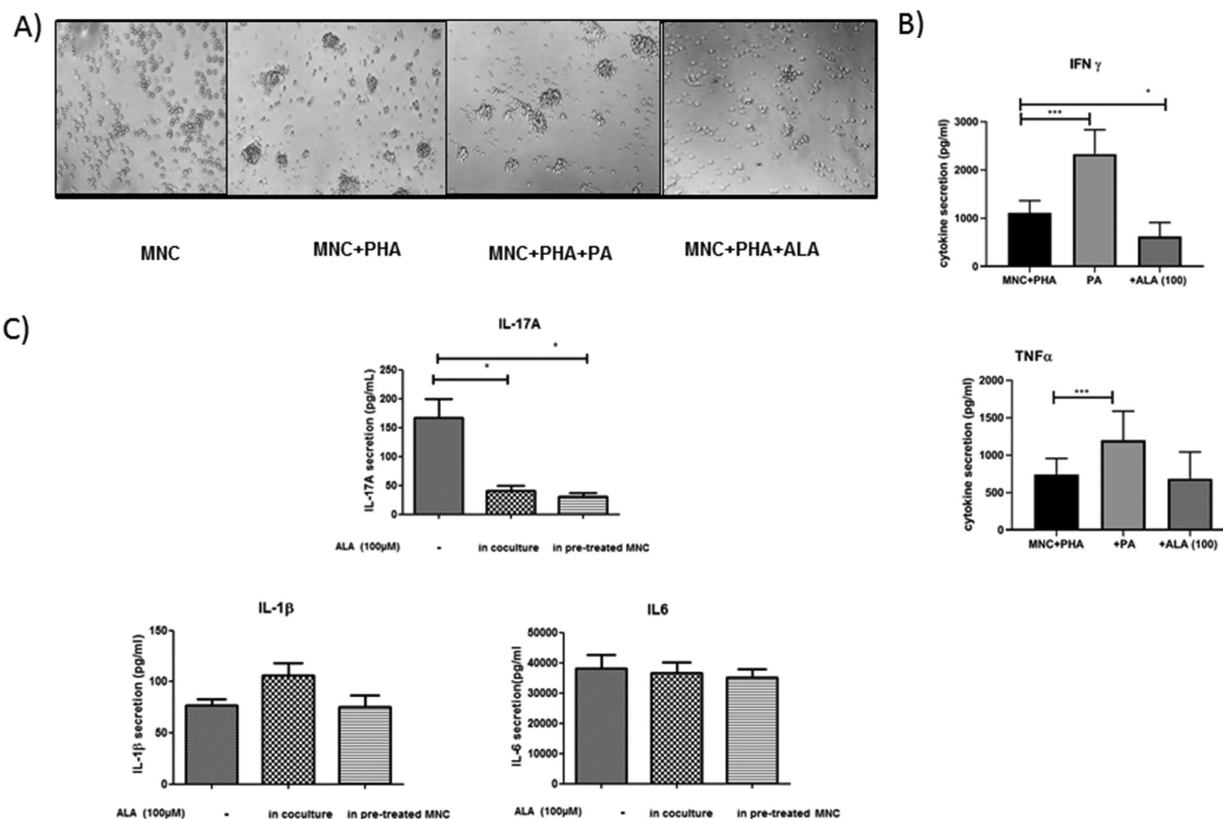
We have previously reported that ICAM-1 is implicated in IL-17A secretion, through induction of cell–cell interactions.<sup>[9]</sup> As expected and as shown in **Figure 4A**, the presence of anti-ICAM-1 monoclonal antibodies (mAb) significantly inhibited IL-17A secretion in the ASC–MNC co-cultures. Of note, neither IL-1 $\beta$  nor IL-6 secretion was inhibited in the presence of anti-ICAM-1 mAb, as it was the case in the presence of n-3 PUFAs (**Figure 1C**). We then evaluated the levels of ICAM-1 mRNA gene expression in ALA-treated co-cultured cells, and observed a dose-dependent decrease of ICAM-1 mRNA expression (**Figure 4B**). Accordingly, at the cell surface level, ICAM-1 expression which clearly increased following PHA activation, was reduced by ALA in co-cultures, and in both monocytes and ASCs (**Figure 4C**, top panels, and **Figure S2**, Supporting Information). Furthermore, the labeling of monocytes and ASCs with specific markers, that is, CD14 and CD105 respectively, revealed an increase of their aggregation following PHA activation, as assessed by the amounts of double pos-

itive cells, but a decrease in the presence of ALA (**Figure 4C**, lower panels).

Altogether these results suggest that ALA inhibits ASC-mediated Th17 cell activation by blocking the ability of PHA to promote cell–cell contacts between mononuclear cells and ASC.

### 3.5. ALA Decreases the Formation of Aggregates among Mononuclear Cells and Subsequent ob-ASC-Mediated IL-17A Secretion

To demonstrate that ALA inhibits cell–cell interactions, we treated MNCs in the absence of ASCs and activated them with PHA. Indeed PHA is known to induce cell aggregates among MNCs, which are visible under light-microscopy as soon as 24 h following its addition in cultures. Addition of ALA clearly inhibited cell aggregate formation, whereas, PA used as negative control, did not (**Figure 5A**, left panel). Moreover, in that condition, ALA partially decreased IFN $\gamma$ , but not TNF $\alpha$  secretion, whereas PA enhanced the secretion of both cytokines (**Figure 5B**). As TNF $\alpha$  is mostly secreted by monocytes, this observation



**Figure 5.** ALA decreases the formation of aggregates among mononuclear cells and subsequent ob-ASC mediated IL-17A secretion. MNCs were activated by PHA, in the presence or absence of ALA, or PA. A) Cell aggregates were shown by light-microscopy. B) The effect of ALA, or PA, on PHA-mediated activation, was measured by ELISA, on TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  secretions. C) MNCs were pre-incubated during 24 h with ALA and PHA, washed, and co-cultured with ob-ASCs in the presence of PHA. As control MNCs were co-cultured with ob-ASCs and PHA in the presence or absence of ALA. IL-17A, IL-1 $\beta$ , and IL-6 secretion were then measured following 48 h activation. Error bars represent standard deviations from  $n = 3$  independent experiments in triplicates. \*, \*\*\*, represents  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ , as obtained by the one-way ANOVA followed by Bonferroni comparison tests.

supports a T-cell specificity for ALA effects following PHA activation. To address whether inhibition of cell aggregate formation could contribute to the inhibition of IL-17A secretion by ALA, we then primed mononuclear cells with ALA, washed them, and cultured them in the presence of ASCs. Results showed a strong inhibition of IL-17A secretion that was similar to that observed when ALA was present during the whole period of co-cultures. However, IL-1 $\beta$  and IL-6 were not inhibited in this two-step experimental process. Thus, these experiments suggest that by inhibiting aggregate formation among mononuclear cells, ALA down-regulates ob-ASC-mediated IL-17A secretion (Figure 5C).

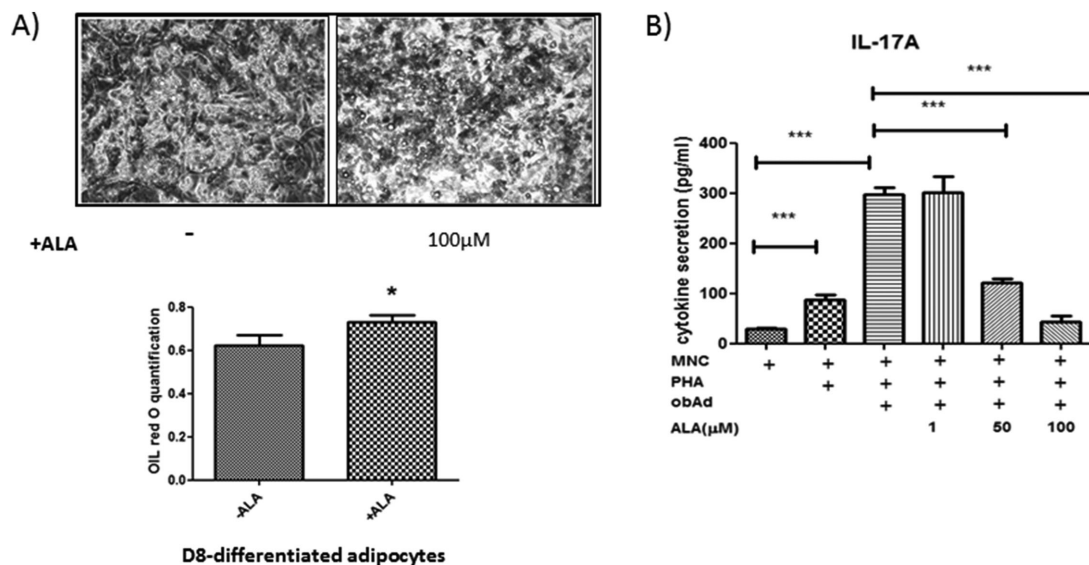
### 3.6. ALA Also Inhibits IL-17A Secretion Mediated by Adipocytes Differentiated from ob-ASCs

We have previously demonstrated that adipocytes differentiated from ob-ASCs also promote Th17 cell activation.<sup>[10]</sup> Here, using the same co-culture model, we measured the ability of ALA to inhibit adipocyte-mediated IL-17A secretion. As shown in Figure 6A, we observed that ALA did not alter the ability of adipocytes to form lipid droplets, as assessed by the quantification of Oil red O staining (Figure 6A), but inhibited IL-17A secretion (Figure 6B).

Therefore, these results indicate that ALA inhibits IL-17A secretion mediated by adipocytes derived from ob-ASCs.

## 4. Discussion

Using a co-culture model that we have previously developed to mimic infiltration of immune cells in adipose tissues, we have reported that adipose-derived stem cells and mature adipocytes as well, play an important role in propagating inflammation through activation of Th17 cells and macrophages in obese individuals.<sup>[9,10]</sup> But, ASCs derived from lean donors were not impaired in their ability to activate those immune cells. Because ALA and its long-chain derivatives, EPA and DHA, have been shown to decrease adipocyte accumulation and inflammation,<sup>[37]</sup> we tested herein whether they would be able to inhibit ASC-mediated activation of Th17 cells following stimulation by PHA. Of interest, we observed that the three n-3 PUFAs were as efficient in this function, while PA, a saturated fatty acid did not modify IL-17A secretion by T cells (Figure 1C). However, none of these three n-3 PUFAs was able to inhibit monocyte cell activation, as assessed by sustained IL-1 $\beta$  and IL-6 secretion levels (Figure 1D). These results suggest thus that n-3 PUFAs may preferentially affect T cell rather than monocyte cell function in



**Figure 6.** ALA inhibits IL-17A secretion mediated by adipocytes differentiated from ob-ASCs. A) ob-ASCs were differentiated into adipocytes, using a previously described protocol, in the presence or absence of ALA (100 μM). Cells were stained for Oil red O, and quantified for their lipid content. B) Adipocytes differentiated from ob-ASCs in the presence of ALA or not, were washed from ALA and plated in the presence of MNCs and PHA for 48 h. IL-17A secretion was measured by ELISA. Error bars represent standard deviations from three independent experiments in triplicates \*, \*\*\*, represent  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ , as obtained by the one-way ANOVA followed by Bonferroni comparison tests.

this model, and that they are not toxic for these cells at the concentrations used in this study. Reinforcing these results, we observed that incubation of immune cells with ALA, in the absence of ASCs, resulted in a decrease of  $\text{IFN}\gamma$  but not  $\text{TNF}\alpha$ , a cytokine preferentially secreted by monocytes. In addition, the addition of PA in PHA-activated mononuclear cells resulted in a strong increase of  $\text{IFN}\gamma$  and  $\text{TNF}\alpha$  production, demonstrating thus opposite effects between n-3 PUFAs and saturated acids. (Figure 5B).

Using a co-culture model with CD8+T cells and adipocytes, Monk et al. have demonstrated that T cell activation by a combination of anti-CD3+CD28 mAb, did not result in fish oil inhibition of IL-1 $\beta$ , IL-6, and  $\text{TNF}\alpha$  monocyte-derived cytokine secretion, even though some of the mRNA encoding for these cytokines were decreased. In contrast, the secretion of those cytokines was inhibited by n-3 PUFAs following stimulation with LPS.<sup>[38,39]</sup> Therefore, the specific inhibition of IL-17A by n-3 PUFAs in our model, could result from our mode of activation which used PHA, a mitogen that preferentially activates T cells.

One of the mechanisms that could explain the selective effect of n-3 PUFAs on IL-17A secretion, following PHA activation of T cells in the presence of ob-ASCs, is likely to be linked to ICAM-1 expression. Indeed, this surface molecule was downregulated by ALA in both monocytes and ASCs (Figure 4C), and on the other hand, ICAM-1 neutralization by the use of an anti-ICAM-1 mAb, induced a pattern of cytokine secretion quite similar to that obtained with ALA treatment, that is, inhibition of IL-17A but not IL-1 $\beta$ , nor IL-6 secretion (Figure 4A). LFA-1, the ligand of ICAM-1, is a  $\beta 2$  integrin which plays an important role in cell-cell interactions.<sup>[40]</sup> Because LFA-1 is expressed by leukocytes, our results suggested to us that by inhibiting ICAM-1 expression on monocytes and ASCs, ALA might reduce the ability of monocytes to communicate with T cells, and/or ASCs to communicate with MNCs. Supporting this possibility, we showed that the number

of cell aggregates among monocytes and ASCs was reduced in the presence of ALA (Figure 4C). Moreover, using a two-step experimental model, we demonstrated that ALA treatment reduced the number of PHA-mediated cell aggregates among MNCs, that is, monocytes and lymphocytes (Figure 5A), which subsequently resulted in the inhibition of ob-ASC mediated IL-17A secretion (Figure 5C). Interestingly, and as negative control, PA did not reduce cell aggregation among mononuclear cells, as shown in Figure 5A.

Through their incorporation into cell membranes and subsequent modification of membrane fluidity, n-3 PUFAs have been shown to alter lipid rafts and subsequent IL-6 signaling leading to Th17 cell polarization.<sup>[41,42]</sup> Accordingly, we showed herein that ALA decreased the levels of STAT-3 phosphorylation, a transcription factor involved in IL-17A secretion (Figure 2). Herein, in addition to the direct impact of n-3 PUFAs on the immunological synapses, we propose an additional effect of ALA on T-cell signaling, related to downregulation of ICAM-1 expression and subsequent reduction of cell-cell interactions and cross talks. Of interest, ICAM-1 serum levels have already been shown to be reduced by ALA in overweight to obese patients with a subsequent improvement in the biomarkers of endothelial dysfunction, blood pressure, and inflammation.<sup>[43]</sup> Moreover, n-3 PUFA-mediated downregulation of adhesion molecule expression in endothelial cells including ICAM-1, have been reported in some other studies.<sup>[44]</sup> However, to our knowledge, the demonstration of an ALA-mediated inhibitory effect on Th17 cell function through decreased ICAM-1 expression, is novel.

Another well-known effect of n-3 PUFAs is the decrease of TLR4 expression, a membrane receptor involved in the transduction mechanisms leading to COX-2 activation.<sup>[34,35]</sup> Analysis of these two proteins in the ASC-MNC co-culture model was consistent with these reports, as we observed that ALA

inhibited COX-2 and TLR4 gene expressions (Figure 3A,B). In addition, by using an inhibitory peptide that blocks TLR4 binding to its ligands, we demonstrated the involvement of TLR4 in IL-17A secretion (Figure 3C). Accordingly, previous studies have reported the requirement of TLR4 for IL-17A secretion and IL-17A-mediated tissue inflammation,<sup>[45–47]</sup> notably through inhibition of IL-23 production.<sup>[48]</sup> Thus, TLR4 deficient mice have been shown to display less severe arthritis, or EAE, together with lower levels of IL-17A secretion.<sup>[45,46]</sup> Moreover, in another model, in which multiple tissue inflammation was induced by IL-17 over-expression, TLR4 deficiency resulted in decreasing neutrophil infiltration, pro-inflammatory cytokine production, and the inflammatory phenotype.<sup>[47]</sup> Because n-3 PUFAs have been shown to alleviate Th17 mediated inflammatory diseases,<sup>[25–28]</sup> and based on our present demonstration of ALA-mediated inhibition of TLR4 expression and subsequent decrease of IL-17A secretion, we can suggest that n-3 PUFAs may play a role in alleviating Th17-mediated inflammatory diseases, through inhibition of TLR4 expression.

Finally, most of the studies which have demonstrated a favorable physiological effect of n-3 PUFAs on the metabolic syndrome, have used consumption of EPA or DHA containing FO, but rarely vegetables containing ALA, due to ALA rapid oxidation and low levels of conversion into EPA and DHA in human, or animals.<sup>[49]</sup> Nevertheless, Welch et al. have demonstrated that ALA conversion into its end products is likely to be greater in non-fish eaters than fish eaters.<sup>[50]</sup> This may account for the beneficial effects of green vegetables supplementation that was observed in vegetarian populations, as this resulted in increasing the content of long-chain n-3 PUFAs in erythrocyte membranes, and membrane protection from oxidative stress.<sup>[51]</sup> Finally, and in agreement of a beneficial effect of ALA on the metabolic syndrome, Ruzivocka et al. reported that adding EPA and DHA to an ALA-based diet potentiated the anti-adipogenic effects of ALA and resulted in a more profound reduction of plasma triglycerides, leptin, and insulin; whereas adding EPA and DHA to diets rich in n-9 fatty acids or n-6 PUFAs was less efficient than the ALA rich diet in reducing body weight increase, or epididymal fat weight, respectively.<sup>[37]</sup> Of interest, we also observed a potentiating effect on IL-17A secretion inhibition, when ALA was added to EPA in our co-culture model (Figure 1C). Therefore, from these studies, one can suggest that dietary ALA may be efficient in reducing weight, and /or inflammation, when used alone in non-fish eaters, or in conjunction with FO in fish eaters.

## 5. Concluding Remarks

We report in the present study that the n-3 PUFA precursor ALA, decreases adipocyte-mediated IL-17A production in human obese AT, through downregulation of ICAM-1, COX-2, and TLR4 expressions. Owing to n-3 PUFAs well-known beneficial effects on fat accumulation,<sup>[52]</sup> and on Th17-mediated inflammatory diseases,<sup>[25–28]</sup> a dietary regimen containing ALA alone in vegetarians, or in association with EPA and/DHA in fish eaters could display beneficial effects in preventing the metabolic syndrome.

## Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

## Acknowledgements

A.E. was responsible for the study concept and design of experiments, interpretation of results, discussion, and compiling of the manuscript. M.C. and J.P. performed experiments and helped in the interpretation, discussion, and redaction of the manuscript. R.W. was responsible for the study concept, performed some experiments and participated to, interpretation, discussion, and compilation of the paper. M.R. furnished the adipose tissue residues from bariatric surgery, and participated in the correction of the manuscript. S.P. performed the Q-PCR experiments. M.-C.M., M.L., and H.V. participated in the interpretation, discussion and/or correction of the paper. This work was supported by the INSERM institute, University Claude Bernard Lyon 1, and the Hospices Civils de Lyon. The authors wish to thank the Rhône-Alpes Region for the scholarship of M.C. and the EDISS doctoral School. The authors thank Dr. Luciano Pirola for critically reading the manuscript. Approval of the Committee for the Protection of Human Subjects of the “Hospices Civils de Lyon” has been obtained for the harvest of bariatric surgery residues. Informed consents was obtained from each patient before surgery.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Keywords

adipose tissue-derived stem cells, ICAM-1, IL-17A, obese adipose tissues, Omega 3 PUFA

Received: October 25, 2018  
Revised: February 22, 2019  
Published online: March 20, 2019

- [1] E. Maury, K. Ehala-Aleksejev, Y. Guiot, R. Detry, A. Vandenhooft, S. M. Brichard, *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2007**, 293, E656.
- [2] T. Suganami, Y. Ogawa, *J. Leukocyte Biol.* **2010**, 88, 33.
- [3] M. Lafontan, *Diabetes Metab.* **2014**, 40, 16.
- [4] M. A. McArdle, O. M. Finucane, R. M. Connaughton, A. M. McMorrow, H. M. Roche, *Front. Endocrinol.* **2013**, 4, <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00052>.
- [5] M. Ahmed, S. L. Gaffen, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2010**, 21, 449.
- [6] M. Sumarac-Dumanovic, D. Stevanovic, A. Ljubic, J. Jorga, M. Simic, D. Stamenkovic-Pejkovic, V. Starcevic, V. Trajkovic, D. Micic, *Int. J. Obes.* **2009**, 33, 151.
- [7] E. Fabbrini, M. Cella, S. A. McCartney, A. Fuchs, N. A. Abumrad, T. A. Pietka, Z. Chen, B. N. Finck, D. H. Han, F. Magkos, C. Conte, D. Bradley, G. Fraterrigo, J. C. Eagon, B. W. Patterson, M. Colonna, S. Klein, *Gastroenterol.* **2013**, 145, 366.
- [8] M. Chehimi, H. Vidal, A. Eljaafari, *J. Clin. Med.* **2017**, 6, 68
- [9] A. Eljaafari, M. Robert, M. Chehimi, S. Chanon, C. Durand, G. Vial, N. Bendridi, A.-M. Madec, E. Disse, M. Laville, J. Rieusset, E. Lefai, H. Vidal, L. Pirola, *Diabetes* **2015**, 64, 2477.
- [10] M. Chehimi, M. Robert, M. E. Bechwaty, G. Vial, J. Rieusset, H. Vidal, L. Pirola, A. Eljaafari, *Adipocyte* **2016**, 5, 275.
- [11] Y. Watanabe, Y. Nagai, K. Takatsu, *Nutrients* **2013**, 5, 3757.

- [12] Y. T. Joffe, M. Collins, J. H. Goedecke, *Nutrients* **2013**, *5*, 1672.
- [13] K. M. Ajuwon, M. E. Spurlock, *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1841.
- [14] Z. D. Alsharari, U. Risérus, K. Leander, P. Sjögren, A. C. Carlsson, M. Vikström, F. Laguzzi, B. Gigante, T. Cederholm, U. De Faire, M.-L. Hellénius, M. Marklund, *PLoS One* **2017**, *12*, e0170684.
- [15] A. P. Simopoulos, *Nutrients* **2016**, *8*, 128.
- [16] K. J. Hintze, J. Tawzer, R. E. Ward, *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **2016**, *111*, 37.
- [17] P. C. Calder, *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 1105.
- [18] P. C. Calder, *J. Nutr.* **2012**, *142*, 592S.
- [19] D. Bagga, L. Wang, R. Farias-Eisner, J. A. Glaspy, S. T. Reddy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 1751.
- [20] Y.-H. Liu, X.-Y. Li, C.-Y. Chen, H.-M. Zhang, J. Kang, *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 1026.
- [21] S. W. Wong, M.-J. Kwon, A. M. K. Choi, H.-P. Kim, K. Nakahira, D. H. Hwang, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27384.
- [22] W. Kong, J.-H. Yen, E. Vassiliou, S. Adhikary, M. G. Toscano, D. Ganea, *Lipids Health Dis.* **2010**, *9*, 12.
- [23] C. N. Serhan, N. Chiang, J. Dalli, *Mol. Aspects Med.* **2018**, *64*, 1.
- [24] J. M. Monk, T. Y. Hou, H. F. Turk, B. Weeks, C. Wu, D. N. McMurray, R. S. Chapkin, *PLoS One* **2012**, *7*, e49739.
- [25] S. Qin, J. Wen, X.-C. Bai, T.-Y. Chen, R.-C. Zheng, G.-B. Zhou, J. Ma, J.-Y. Feng, B.-L. Zhong, Y.-M. Li, *Mol. Med. Rep.* **2014**, *9*, 2097.
- [26] W. Kong, J.-H. Yen, D. Ganea, *Brain, Behav., Immun.* **2011**, *25*, 872.
- [27] K. Unoda, Y. Doi, H. Nakajima, K. Yamane, T. Hosokawa, S. Ishida, F. Kimura, T. Hanafusa, *J. Neuroimmunol.* **2013**, *256*, 7.
- [28] H. Shoda, R. Yanai, T. Yoshimura, T. Nagai, K. Kimura, L. Sobrin, K. M. Connor, Y. Sakoda, K. Tamada, T. Ikeda, K.-H. Sonoda, *PLoS One* **2015**, *10*, e0138241.
- [29] P. Bourin, B. A. Bunnell, L. Casteilla, M. Dominici, A. J. Katz, K. L. March, H. Redl, J. P. Rubin, K. Yoshimura, J. M. Gimble, *Cytotherapy* **2013**, *15*, 641.
- [30] P. C. Calder, *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 1073.
- [31] X. O. Yang, A. D. Panopoulos, R. Nurieva, S. H. Chang, D. Wang, S. S. Watowich, C. Dong, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 9358.
- [32] K. Boniface, K. S. Bak-Jensen, Y. Li, W. M. Blumenschein, M. J. McGeachy, T. K. McClanahan, B. S. McKenzie, R. A. Kastelein, D. J. Cua, R. de Waal Malefyt, *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 535.
- [33] J. Lee, T. Aoki, D. Thumkeo, R. Siriwach, C. Yao, S. Narumiya, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *143*, 631.
- [34] H.-Q. Liu, Y. Qiu, Y. Mu, X.-J. Zhang, L. Liu, X.-H. Hou, L. Zhang, X.-N. Xu, A.-L. Ji, R. Cao, R.-H. Yang, F. Wang, *Nutr. Res.* **2013**, *33*, 849.
- [35] P. C. Norris, E. A. Dennis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 8517.
- [36] T. Lysakova-Devine, B. Keogh, B. Harrington, K. Nagpal, A. Halle, D. T. Golenbock, T. Monie, A. G. Bowie, *J. Immunol.* **2010**, *185*, 4261.
- [37] J. Ruzickova, M. Rossmeisl, T. Prazak, P. Flachs, J. Sponarova, M. Vecka, E. Tvrzicka, M. Bryhn, J. Kopecky, *Lipids* **2004**, *39*, 1177.
- [38] J. M. Monk, D. M. Liddle, A. A. De Boer, M. J. Brown, K. A. Power, D. W. Ma, L. E. Robinson, *J. Nutr.* **2015**, *145*, 829.
- [39] J. M. Monk, D. M. Liddle, M. J. Brown, L. Zarepoor, A. A. De Boer, D. W. L. Ma, K. A. Power, L. E. Robinson, *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 621.
- [40] R. Rothlein, M. L. Dustin, S. D. Marlin, T. A. Springer, *J. Immunol.* **1986**, *137*, 1270.
- [41] J. M. Monk, T. Y. Hou, H. F. Turk, D. N. McMurray, R. S. Chapkin, *J. Nutr.* **2013**, *143*, 1501.
- [42] M. J. Allen, Y.-Y. Fan, J. M. Monk, T. Y. Hou, R. Barhoumi, D. N. McMurray, R. S. Chapkin, *J. Nutr.* **2014**, *144*, 1306.
- [43] S. Egert, A. Baxheinrich, Y. H. Lee-Barkey, D. Tschöepe, U. Wahrburg, B. Stratmann, *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 1315.
- [44] E. J. Baker, M. H. Yusof, P. Yaquob, E. A. Miles, P. C. Calder, *Mol. Aspects Med.* **2018**, *64*, 169.
- [45] S. Abdollahi-Roodsaz, L. A. B. Joosten, M. I. Koenders, I. Devesa, M. F. Roelofs, T. R. D. J. Radstake, M. Heuvelmans-Jacobs, S. Akira, M. J. H. Nicklin, F. Ribeiro-Dias, W. B. van den Berg, *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 205.
- [46] J. M. Reynolds, G. J. Martinez, Y. Chung, C. Dong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 13064.
- [47] H. Tang, S. Pang, M. Wang, X. Xiao, Y. Rong, H. Wang, Y. Q. Zang, *J. Immunol.* **2010**, *185*, 2563.
- [48] K. I. Happel, M. Zheng, E. Young, L. J. Quinton, E. Lockhart, A. J. Ramsay, J. E. Shellito, J. R. Schurr, G. J. Bagby, S. Nelson, J. K. Kolls, *J. Immunol.* **2003**, *170*, 4432.
- [49] S. Ikemoto, M. Takahashi, N. Tsunoda, K. Maruyama, H. Itakura, O. Ezaki, *Metabolism.* **1996**, *45*, 1539.
- [50] A. A. Welch, S. Shakya-Shrestha, M. A. Lentjes, N. J. Wareham, K.-T. Khaw, *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *92*, 1040.
- [51] H. V. Chopra, S. H. Kehoe, S. A. Sahariah, H. N. Sane, V. A. Cox, D. V. Tarwade, B. M. Margetts, R. D. Potdar, C. H. Fall, S. R. Joshi, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2018**, *27*, 804.
- [52] M. Todorčević, L. Hodson, *J. Clin. Med.* **2015**, *5*, 3.



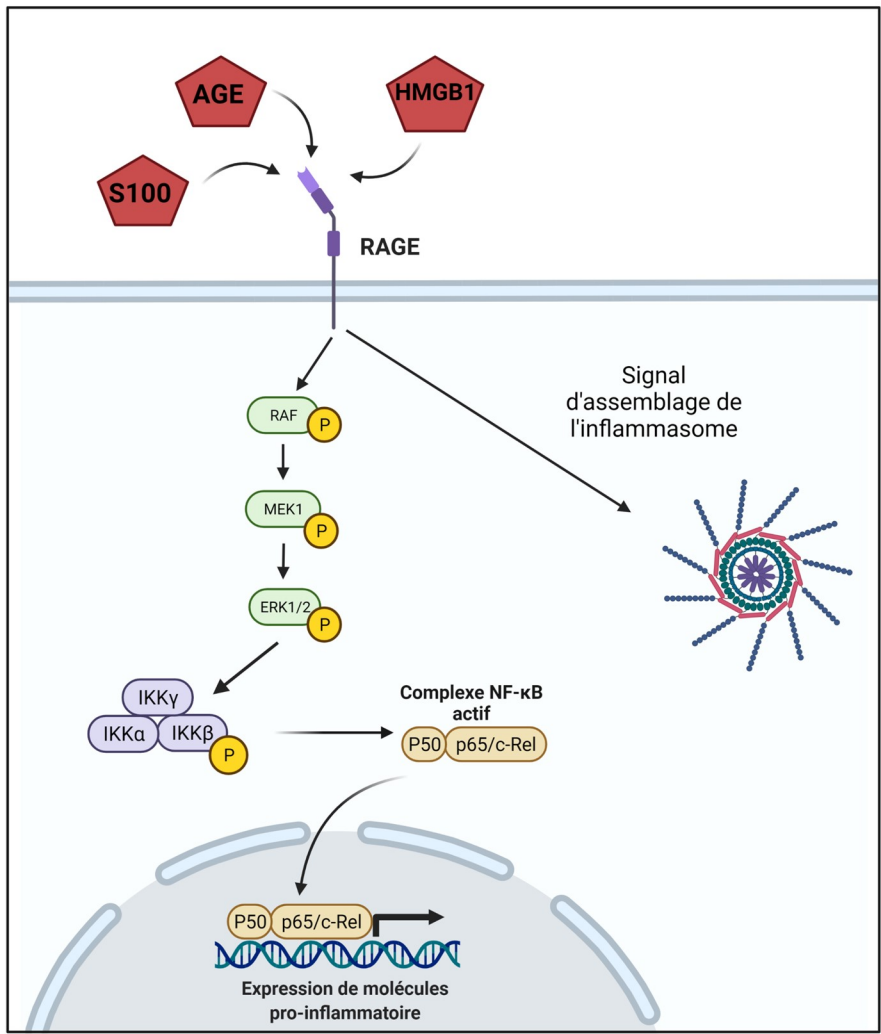
## Article 3

**Implication de l'albumine glyquée dans la polarisation des lymphocytes Th17 par les cellules souches adipocytaires.**

Involvement of glycated albumin in adipose-derived-stem cell-mediated interleukin 17 secreting T helper cell activation.

*Julien Pestel, Maud Robert, Sara Corbin, Hubert Vidal, Assia Eljaafari.*

World Journal of Stem Cells, 2020.



**Figure 24 : Voie de signalisation du récepteur RAGE.**

## A. Contexte scientifique de l'étude

### Rôle de l'albumine glyquée dans la pathogénèse des CSA

L'une des caractéristiques communes aux différents types de diabète (DT1 et DT2) est l'hyperglycémie qui a pour conséquence la glycation et l'oxydation des protéines, aboutissant à la formation « Advanced glycation end-product » (AGEs). Les AGEs sont formés suite aux réactions non-enzymatiques de Maillard entre les sucres et certains acides aminés des protéines (Rondeau et al., 2010). Leur rôle délétère dans de nombreuses pathologies a déjà été démontré notamment au cours du DT1 et DT2 (Stitt et al., 2002), de l'athérosclérose (Yamagishi and Matsui, 2018) mais également dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Li et al., 2012). D'ailleurs, la mesure de l'hémoglobine glyquée est un paramètre de référence du suivi du diabète. (Lyons and Basu, 2012) car elle les conséquences de l'hyperglycémie sur 3 mois. L'albumine est la protéine plasmatique la plus abondante. De fait, comme les autres protéines du sang, telles que l'hémoglobine, l'albumine est glyquée, au cours du diabète. D'ailleurs, le rôle de l'albumine glyquée comme potentiel biomarqueur du diabète est à l'étude (Bhat et al., 2017). En effet, l'albumine glyquée a un cycle de vie plus court que l'hémoglobine glyquée (2 à 4 semaines) ainsi sa mesure pourrait permettre un diagnostic et un suivi plus précoce du diabète (Koga and Kasayama, 2010). Les effets délétères des AGEs, notamment l'induction de l'inflammation, sont dues à la fixation des AGEs sur leur récepteur, « receptor of advanced glycated end products » (RAGE). Le récepteur RAGE est capable de lier également d'autres ligands comme l'HMGB1 et la « S100 calcium-binding protein B ». La fixation d'un ligand sur RAGE conduit notamment à l'activation de la voie des MAP/ERK kinases aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires (**Figure 24**). Par ailleurs les AGE, et l'HMGB1 sont également capables d'apporter le second signal de danger nécessaire à l'activation de l'inflammasome et de la voie NF- $\kappa$ B. La voie AGE/RAGE est notamment impliquée dans les vasculopathies ou les néphropathies liées au diabète. Ainsi, l'utilisation d'anticorps bloquant le récepteur RAGE ou les AGEs, a démontré le rôle de cette voie dans ces maladies en diminuant la perméabilité vasculaire et en atténuant les complications rénales (Flyvbjerg et al., 2004; Wautier et al., 1996).

Les AGEs sont capables d'induire l'augmentation d'expression de RAGE sur des lymphocytes T naïfs et dans le même temps de favoriser la polarisation de ces derniers en

Th1/Th17 (Han et al., 2014). Aussi, les lymphocytes T qui expriment RAGE produisent plus d'IL-17A que les lymphocytes RAGE- d'un même sujet diabétique de type 1 (Akirav et al., 2012). L'implication des lymphocytes Th17 et de l'IL-17A/F dans la pathogenèse du diabète de type 1 a clairement été démontrée, en premier lieu, dans un modèle murin de diabète auto-immun spontané. En effet, l'expression de l'IL-17A/F a été corrélée à l'inflammation des îlots de Langerhans (Martin-Orozco et al., 2009). De plus, l'utilisation d'anticorps bloquant l'IL-17A a considérablement diminué le développement du diabète dans ce même modèle (Emamaullee et al., 2009). La délétion du gène de l'IL-17A améliore le diabète induit par la streptozotocine chez des souris, notamment en induisant la diminution de l'hyperglycémie et de l'infiltration des lymphocytes T cytotoxiques dans le pancréas (Tong et al., 2015). Chez l'Homme, les lymphocytes CD4+ du sang périphérique provenant d'enfants atteints de diabète de type 1, produisent des niveaux plus élevés d'IL-17, d'IL-22 et une expression accrue des gènes RORC et FOXP3 en comparaison à ceux d'individus sains, lors de leur activation, mais sans modification du profil des Th1. D'ailleurs les lymphocytes mémoire chez ces mêmes enfants, expriment également l'IL-17, l'IL-22 et FOXP3 suggérant que la voie de l'IL-17 est bien activée *in vivo*, chez les patients diabétiques (Reinert-Hartwall et al., 2015).

Par ailleurs il a été rapporté que l'incubation de CSM humaines en présence d'AGEs entraîne une diminution de la prolifération des CSM, l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la différenciation en adipocyte (Kume et al., 2005). Les AGEs induisent également une diminution de la réponse à l'insuline des adipocytes via la génération de ROS (Unoki et al., 2007).

## B. Résumé de l'article

Notre équipe a précédemment démontré le rôle des CSA issues de tissu adipeux provenant de sujets obèses (et non de sujets minces), dans la polarisation des lymphocytes Th17 et dans l'altération du métabolisme via une diminution de la sensibilité à l'insuline et de l'adipogenèse des CSA. Dans la présente étude, nous avons cherché à déterminer le rôle potentiel de l'axe AGE/RAGE sur la polarisation des lymphocytes Th17 médiée par les CSA d'individus obèses ou minces. La voie AGE/RAGE est notamment impliquée dans les vasculopathies ou les néphropathies liées au diabète. D'ailleurs, l'utilisation d'anticorps bloquant le récepteur RAGE ou les AGEs, démontre le rôle de cette voie en diminuant la perméabilité vasculaire et en atténuant les complications rénales (Flyvbjerg et al., 2004; Wautier et al., 1996). De plus, il a été démontré que lymphocytes T de patients diabétiques de type 1 (DT1) expriment des niveaux élevés de RAGE intracellulaire en corrélation avec à une

meilleure survie des lymphocytes T auto-immuns et à une libération de cytokines inflammatoires (Durning et al., 2016). L'interaction AGE/RAGE est également connue pour jouer un rôle dans la réponse immunitaire impliquant l'IL-17A, comme le montre l'augmentation d'expression de RAGE induite par les AGE dans les lymphocytes des patients DT1, entraînant une augmentation de la sécrétion d'IL-17A (Akirav et al., 2012). Nous avons alors co-cultivé des CSA de sujets minces ou obèses avec des CMN, en présence d'albumine glyquée et nous avons utilisé un anticorps bloquant le récepteur des AGEs afin d'évaluer son effet sur la polarisation des lymphocytes.

**- L'albumine glyquée augmente faiblement la sécrétion d'IL-17A médiée par les CSA obèses.** Nous avons en premier lieu cherché à évaluer l'effet de l'albumine glyquée sur la sécrétion d'IL-17A médié par les CSA obèses. Pour cela nous avons co-cultivé les cellules en présence de 1% d'albumine ou de 1% d'albumine glyquée. La sécrétion d'IL-17A n'a que faiblement augmenté en présence d'albumine glyquée. Néanmoins, la sécrétion de TNF $\alpha$  a nettement augmenté, suggérant donc que l'activation de la voie Th17 médiée par les CSAob était déjà quasiment optimale.

**- Les CSA de sujets minces induisent une sécrétion plus importante d'IL-17A, de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes, en présence d'albumine glyquée.** De façon à nous placer dans des conditions suboptimale nous avons par la suite évalué l'effet de l'albumine glyquée sur l'induction de la sécrétion de cytokines inflammatoire par les CSA de sujets minces. L'incubation d'albumine glyquée en présence de CSA provenant de sujets minces induit une augmentation de la sécrétion d'IL-17A, TNF- $\alpha$  et IFN $\gamma$ .

**- L'albumine glyquée induit l'expression de RAGE et de HLA-DR dans les co-cultures CSA-CMN.** Etant donné que la glycation de l'albumine active la voie d'activation des récepteurs RAGE, nous avons ensuite étudié si l'expression de RAGE était augmentée au sein des co-cultures conduisant à la production d'IL-17A. Nous avons observé que l'expression de RAGE était augmentée en présence d'albumine glyquée ainsi que celle du CMH de classe II (HLA-DR), signe d'inflammation.

**- L'anticorps anti-RAGE inhibe spécifiquement la production d'IL-17A.** Afin de valider le rôle de la voie RAGE, nous avons ensuite utilisé un anticorps monoclonal dirigé contre RAGE. Le blocage de l'interaction entre albumine glyquée et RAGE par des anticorps neutralisants a permis d'inhiber l'expression de RAGE et du CMH de classe II. La sécrétion

d'IL-17A a également été inhibée avec ces anticorps en parallèle, et spécifiquement puisque la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  n'a pas été impactée par la neutralisation de l'IL-17A.

Ainsi, en utilisant des CSAob co-cultivées avec des CMN et incubées avec de l'albumine glyquée, nous avons observé une faible sécrétion d'IL-17A. A l'inverse, l'utilisation de CSA issues de sujets minces dans ce même modèle a permis d'induire une augmentation significative de la sécrétion d'IL-17A. L'axe AGE/RAGE est impliqué dans les mécanismes pro-inflammatoires conduisant à une inflammation chronique. RAGE est exprimé de manière constitutive par les lymphocytes T de patients diabétiques et est connu pour activer la voie NF $\kappa$ B conduisant à la production de cytokines inflammatoires (Cohen et al., 2003). Nous avons démontré ici que RAGE est également impliqué dans l'activation des cellules Th17, mais pas dans l'activation des cellules Th1, puisque seule la sécrétion d'IL-17A a été inhibée par l'anticorps bloquant RAGE. Un effet différentiel similaire de RAGE sur la production d'IL-17A et de TNF $\alpha$  a également été observé dans le DT1. En effet, les lymphocytes T exprimant RAGE expriment des niveaux plus élevés d'IL-17A mais pas de TNF $\alpha$  ni d'IFN $\gamma$ , par rapport aux lymphocytes n'exprimant pas RAGE chez les mêmes patients (Akirav et al., 2012). Confirmant l'implication de RAGE dans l'activation des lymphocytes T médiée par les CSA, nous avons observé une augmentation d'expression de RAGE, ainsi que l'expression du CMH de classe II (HLA-DR) lorsque l'albumine glyquée a été ajoutée aux co-cultures, et une abolition de cet effet en présence de l'anticorps bloquant RAGE ce qui a entraîné de façon simultanée la sécrétion d'IL-17A.

Il est intéressant de noter que les cytokines IL-17A/F ont été impliquées dans la pathogénicité du DT1 (Abdel-Moneim et al., 2018), notamment via leur localisation dans le tissu adipeux péri-pancréatique (Shao et al., 2016).

En effet, la délétion de la Sentrin-specific protease 1 (SEN1), une protéase de type SUMO, spécifiquement au niveau du tissu adipeux, a entraîné l'activation de NF $\kappa$ B et la sécrétion de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires dans le tissu adipeux péri-pancréatique, conduisant au recrutement de cellules immunitaires, notamment les cellules Th17 (Shao et al., 2016). L'invalidation de SEN1 chez ces souris a en outre induit le développement d'un DT1 suite à la mort des cellules  $\beta$  (L. Shao et al., 2015). De plus, renforçant le rôle potentiel du tissu adipeux péri-pancréatique en tant que facteur pathogène conduisant au dysfonctionnement des cellules  $\beta$ , il a été démontré que la graisse pancréatique est inversement associée à la sécrétion d'insuline chez les personnes présentant une glycémie à jeun altérée et/ou une intolérance au glucose De

plus, dans cette étude, le tissu adipeux péri-pancréatique s'est avéré être un déterminant plus important de l'altération de la sécrétion d'insuline que la graisse viscérale (Heni et al., 2010).

En conclusion, nous avons montré ici que la présence d'albumine glyquée améliore la sécrétion d'IL-17A médiée par les CSA de sujets minces, grâce à un mécanisme nécessitant la signalisation via RAGE. Notre étude suggère donc un nouveau mécanisme par lequel les CSA pourraient contribuer au DT1 via la production d'IL-17A médiée par les AGE au sein du tissu adipeux péri-pancréatiques des individus minces.

## Basic Study

## Involvement of glycated albumin in adipose-derived-stem cell-mediated interleukin 17 secreting T helper cell activation

Julien Pestel, Maud Robert, Sara Corbin, Hubert Vidal, Assia Eljaafari

**ORCID number:** Julien Pestel 0000-0002-2438-5705; Maud Robert 0000-0002-0176-5326; Sara Corbin 0000-0003-4790-0439; Hubert Vidal 0000-0002-9467-0317; Assia Eljaafari 0000-0002-8300-540X.

**Author contributions:** Pestel J performed the experiments, acquired and analyzed data and was involved in data interpretation and in the writing of the manuscript; Robert M provided the residual adipose tissues and participated in the writing of the manuscript; Corbin S supervised the statistical data and helped in the revision of the manuscript; Vidal H participated in the design of the study, data interpretation, and writing of the manuscript; Eljaafari A designed, coordinated the study, was involved in data interpretation and in the writing of the manuscript. All authors approved the final version of the article.

**Institutional review board**

**statement:** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical

**Julien Pestel, Maud Robert, Hubert Vidal, Assia Eljaafari,** INSERM U1060 CarMen, Batiment CENS-ELI, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite 69310, France

**Julien Pestel, Maud Robert, Hubert Vidal, Assia Eljaafari,** Faculty of Medicine, Université Claude Bernard Lyon 1, Batiment CENS-ELI, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite 69310, France

**Maud Robert,** Department of Surgery in Gastro-enterology, Edouard Herriot Hospital, Lyon 69003, France

**Sara Corbin,** Public Health Department, Hospices Civils de Lyon, 1 quai des célestins Lyon 69002, France

**Assia Eljaafari,** DO-IT Research Team, Hospices Civils de Lyon, 1 quai des célestins, Lyon 69002, France

**Corresponding author:** Assia Eljaafari, MD, PhD, Doctor, Senior Scientist, CarMeN Laboratory, INSERM U1060, University Claude Bernard Lyon 1 and Hospices Civils de Lyon, Batiment CENS-ELI, Centre Hospitalier Lyon Sud, 165 chemin du Grand Revoyet, Pierre Bénite 69310, France. [assia.eljaafari@univ-lyon1.fr](mailto:assia.eljaafari@univ-lyon1.fr)

**Abstract****BACKGROUND**

Advanced glycation end products (AGE) are a marker of various diseases including diabetes, in which they participate to vascular damages such as retinopathy, nephropathy and coronaropathy. Besides those vascular complications, AGE are involved in altered metabolism in many tissues, including adipose tissue (AT) where they contribute to reduced glucose uptake and attenuation of insulin sensitivity. AGE are known to contribute to type 1 diabetes (T1D) through promotion of interleukin (IL)-17 secreting T helper (Th17) cells.

**AIM**

To investigate whether lean adipose-derived stem cells (ASC) could be able to induce IL-17A secretion, with the help of AGE.

**METHODS**

As we have recently demonstrated that ASC are involved in Th17 cell promotion when they are harvested from obese AT, we used the same co-culture model to

standards. The Committee for people Protection emanating from the Research Ministry, has given us its approval for the use of human adipose tissues isolated from residues of visceral surgery. Informed consents were signed by each donor.

**Conflict-of-interest statement:** No potential conflicts of interest were disclosed.

**Data sharing statement:** No additional data are available.

**Open-Access:** This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Manuscript source:** Invited manuscript

**Received:** February 28, 2020

**Peer-review started:** February 28, 2020

**First decision:** April 18, 2020

**Revised:** May 19, 2020

**Accepted:** June 10, 2020

**Article in press:** June 10, 2020

**Published online:** July 26, 2020

**P-Reviewer:** Popovic DS, Ventura C

**S-Editor:** Liu M

**L-Editor:** A

**E-Editor:** Xing YX



measure the impact of glycated human serum albumin (G-HSA) on human lean ASC interacting with blood mononuclear cells. IL-17A and pro-inflammatory cytokine secretion were measured by ELISA. Receptor of AGE (RAGE) together with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), human leukocyte Antigen (HLA)-DR, cluster of differentiation (CD) 41, and CD62P surface expressions were measured by cytofluorometry. Anti-RAGE specific monoclonal antibody was added to co-cultures in order to evaluate the role of RAGE in IL-17A production.

## RESULTS

Results showed that whereas 1% G-HSA only weakly potentiated the production of IL-17A by T cells interacting with ASC harvested from obese subjects, it markedly increased IL-17A, but also interferon gamma and tumor necrosis factor alpha production in the presence of ASC harvested from lean individuals. This was associated with increased expression of RAGE and HLA-DR molecule by co-cultured cells. Moreover, RAGE blockade experiments demonstrated RAGE specific involvement in lean ASC-mediated Th-17 cell activation. Finally, platelet aggregation and ICAM-1, which are known to be induced by AGE, were not involved in these processes.

## CONCLUSION

Thus, our results demonstrated that G-HSA potentiated lean ASC-mediated IL-17A production in AT, suggesting a new mechanism by which AGE could contribute to T1D pathophysiology.

**Key words:** Interleukin 17 secreting T helper cells; Lean adipose tissue; Type 1 diabetes; Advanced glycation end products; Adipose-derived stem cells

©The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** Using a coculture model with human lean adipose-derived stem cells (ASC) and mononuclear cells, we have shown in this study that glycated human serum albumin (G-HSA) enhances lean ASC-mediated interleukin (IL)-17A, interferon gamma and tumor necrosis factor alpha secretion. This effect involved the advanced glycated end products (AGE)/Receptor of advanced glycated end products (RAGE) axis as assessed by anti-RAGE blocking antibodies and was associated with increased expression of RAGE and human leukocyte antigen-DR molecules. Thus, our results demonstrated that G-HSA potentiated lean ASC-mediated IL-17A production in adipose tissues, suggesting a new mechanism by which AGE could contribute to type 1 diabetes pathophysiology.

**Citation:** Pestel J, Robert M, Corbin S, Vidal H, Eljaafari A. Involvement of glycated albumin in adipose-derived-stem cell-mediated interleukin 17 secreting T helper cell activation. *World J Stem Cells* 2020; 12(7): 621-632

**URL:** <https://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v12/i7/621.htm>

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v12.i7.621>

## INTRODUCTION

Glycated proteins result from non-enzymatic Maillard reactions between sugars and amine residues, mostly lysine and arginine<sup>[1]</sup>. While in the healthy body all proteins can be modified by non-enzymatic glycation reactions, advanced glycation end products (AGE) are known to exert deleterious effects on human health when they are too abundant, as observed in diabetes, arteriosclerosis, renal failure and also in Alzheimer, and Parkinson diseases<sup>[2-4]</sup>. Although glycated haemoglobin is a major biomarker for diabetes mellitus diagnosis<sup>[5]</sup>, the role of glycated albumin as a potential diagnostic marker<sup>[6]</sup> is currently under investigation, due to the higher levels of albumin in blood, its shorter life, and its independence from haemolytic processes<sup>[7-9]</sup>. In addition to modifications of protein structure and function, AGE pathogenic effects mostly result from binding and activation of specific receptors, named receptor of advanced glycated end products (RAGE)<sup>[10,11]</sup>. Those receptors belong to the immunoglobulin superfamily of transmembrane proteins<sup>[12]</sup>. Besides AGE, RAGE can

bind a variety of molecules, such as the high mobility group box-1, the  $\beta$ -amyloid peptide and the S100/calgranulin<sup>[13]</sup>. Interaction of RAGE ligands with RAGE, initiate a cascade of signalization leading to activation of p21<sup>ras</sup>, p44/p42 mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappa B (NFkB), which generally results in the synthesis of proinflammatory cytokines<sup>[14-16]</sup>. The implication of AGE/RAGE in diabetes pathophysiology has been demonstrated using RAGE blockade experiments able to inhibit diabetes dysfunctions in vessels or in organs, while AGE injection in mice provoked such dysfunctions<sup>[17-19]</sup>.

T-lymphocytes play an important role in diabetes, either through activation of auto-immune cells directed against beta-pancreatic cells in the case of type 1 diabetes (T1D), or through infiltration of tissues or organs such as adipose tissue (AT) in type 2 diabetes (T2D). In T1D, contribution of AGE/RAGE to diabetes evolution has been clearly demonstrated. For example, RAGE blockade experiments prevented diabetes transfer with diabetogenic T cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice<sup>[20]</sup>. Moreover, T cells from T1D patients or from at risk diabetes relatives, have been shown to express elevated levels of intra-cellular RAGE associated with increased T cell survival and inflammatory cytokine release<sup>[21]</sup>. AGE/RAGE interaction is also known to play a role in interleukin (IL)-17 immune responses as shown by AGE-mediated up-regulation of RAGE expression in T cells of T1D patients, which resulted in increased IL-17A secretion<sup>[22]</sup>.

The interleukin 17 secreting T helper (Th17) cell subset has been recently discovered as a T-cell inflammatory lineage that mainly secretes IL-17A and IL-17F cytokine whose receptors are ubiquitously expressed<sup>[23]</sup>. Those receptors are able to spread inflammation due to their ability to activate secretion of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinases following IL-17A binding<sup>[24]</sup>.

We have recently implicated adipose-derived-stem cells (ASC) and adipocytes (AD) in the promotion of Th17 cells through cell-to-cell contact-dependent interactions with blood mononuclear cells (MNC)<sup>[25,26]</sup>. This function was likely to be mostly displayed by ASC obtained from obese rather than from lean individuals and resulted in inhibiting adipogenesis and insulin response of obese ASC and AD, respectively. In the present study, we aimed to determine the potential role of the AGE/RAGE axis on ASC-mediated Th17 promotion in lean individuals. Therefore, we investigated herein whether glycated albumin would induce IL-17A secretion by T cells, and whether anti-RAGE monoclonal antibody (mAb) would prevent this activation. To this purpose, we co-cultured lean ASC with MNC and treated them with glycated human serum albumin (G-HSA). We observed that G-HSA increased IL-17A secretion but also, Interferon gamma (IFN $\gamma$ ), and Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) secretion and that anti-RAGE mAb specifically inhibited IL-17A secretion.

## MATERIALS AND METHODS

### *Isolation and expansion of ASC*

Subcutaneous or visceral AT samples were isolated from residues of bariatric surgery of obese subjects (body mass index > 30 kg/m<sup>2</sup>), or visceral surgery of lean controls with the informed consent of patients. AT samples (50-100 mg) were fragmented and incubated in 2 g/L of collagenase type Ia solution (Sigma Aldrich, C2674) dissolved in Dulbecco's modified eagles medium:Ham F12 (DMEM:F-12) medium (1:1 mL/L) (Invitrogen) for 40 min at 37 °C by mixing. Collagenase action was quenched by the addition of 1:1 mL/L of DMEM:F-12 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS). The released stromal vascular fraction (SVF) was recovered by centrifugation (800 g for 7 min at 25 °C). Residual red blood cells were lysed by hypotonic shock and the ASC component of SVF was selectively expanded in culture medium composed of DMEM:F-12 supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L L-glutamine and 100 U/mL penicillin-streptomycin. Half of the culture medium was changed every two to 3 d. ASC were amplified by several passages in culture (3 to 4) and directly used for experiments or stored in liquid nitrogen. The multipotent phenotype of ASC was validated by differentiating ASC into AD or osteoblasts, depending on the differentiation medium used, as previously reported<sup>[25]</sup>. ASC phenotype was assessed by staining with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated, phycoerythrin (PE)-conjugated, allophycocyanin (APC)-conjugated mouse anti-human cell surface markers (from ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Germany) as recommended by the International Society for Cellular Therapy<sup>[27]</sup>, and revealed a cluster of differentiation (CD) 90+, CD105+, CD73+, and CD45- pattern (**Supplement Figure 1**).

### **Isolation of blood MNC**

Blood samples were obtained through the Blood Bank Center of Lyon (France), following institutionally approved guidelines. MNC were harvested from healthy human peripheral blood by density gradient centrifugation (Ficoll-Histopaque Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). MNC were stored in liquid nitrogen prior to use.

### **Co-culture assays and blockade experiments**

ASC were harvested and seeded in 96-well plates (20000 cells/well) for 18-24 h in 200  $\mu$ L of basal culture medium (DMEM:F-12 medium, 1:1 mL/L supplemented with 10% FCS). 100000 MNC were co-seeded for 48 h in the presence or absence of phytohaemagglutinin (PHA), 5  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich). Different ratios of ASC:MNC were used, as indicated in figure legends. Cells were incubated in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 supplemented with either 1% human serum albumin (HSA) or 1% G-HSA, both from Sigma Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). Supernatant was harvested after 48 h, and frozen. In blockade experiments anti-RAGE monoclonal antibody (RetD Systems, Lille, France) was added at 20  $\mu$ g/mL during the whole period of culture.

### **Flow cytometry**

FITC, PE, or APC conjugated mouse anti-human CD73, CD90, CD105, CD3, CD41 CD62P, human leukocyte antigen (HLA)-DR, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), CD8 (all from Immunotools) were used to label the various cells tested. Analyses were performed using the "LSR II 3 lasers" cytofluorometer and the Diva software (both were from BD Biosciences).

### **Cytokine secretion**

IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  secretions were measured by ELISA, using the corresponding antibodies (e-Biosciences, Paris, France).

### **Statistical analysis**

One- or two-way repeated measures ANOVA, were used to compare multiple criteria. When some values were missing, mixed effects analyses were used. When the ANOVA or mixed effects analyses were significant, Bonferroni post hoc tests were used to do two-by-two analyses, taking into account the multiple comparisons. Paired *t* tests were used to compare two criteria, in univariate analysis. Differences were considered as statistically significant when *P* value was < 0.05. The analyses were done using Graphpad Prism 8 software.

---

## **RESULTS**

---

### **G-HSA only weakly increases the levels of IL-17A promoted by obese ASC**

We have previously reported that obese ASC activate IL-17A production by T cells in the presence of PHA. To investigate whether glycated albumin would increase the levels of IL-17A, we co-cultured the cells either in the presence of 1% HSA, or 1% G-HSA. Graded concentrations of ASC were co-cultured with the optimal concentration of MNC and activated with PHA. Although IL-17A secretion weakly increased, the two-way ANOVA multi-comparison tests did not show significant results whether HSA or G-HSA were added to cultures. But TNF $\alpha$  clearly increased (*P* = 0.0165 in two-way ANOVA). Thus, these results demonstrated a weak, but non-significant effect of G-HSA on Th17 stimulation by obese ASC, but an increase in TNF $\alpha$  production.

### **Lean ASC mediate higher levels of IL-17A, TNF $\alpha$ , and IFN $\gamma$ secretion by T cells, in the presence of G-HSA**

Because we have previously reported that lean ASC mediate IL-17A production at much lower levels than obese ASC, we investigated whether AGE could increase this production. Therefore, we co-cultured lean ASC with MNC in the presence of HSA, or G-HSA, and activated the co-cultures with PHA. Secretion of IL-17A was measured and showed a significant increase in the presence of G-HSA (*P* = 0.0196 in post-hoc Bonferroni tests). Interestingly, T helper 1 cytokines were also increased in the presence of G-HSA such as IFN $\gamma$  (*P* = 0.0065 in Bonferroni post-hoc tests), and TNF $\alpha$  (*P* = 0.0037 in Bonferroni post-hoc tests). However, IL-6 and IL-1 $\beta$ , which are mostly

secreted by ASC and monocytes in this model, did not show significant differences in post-hoc Bonferroni tests, even though mixed effect analyses showed significance, suggesting a specific effect of G-HSA on T cells.

### **G-HSA increases RAGE and HLA-DR expression in ASC/MNC co-cultured cells**

We then investigated whether RAGE expression would be increased in the co-cultures of lean ASC and T cells leading to IL-17A production. We observed that the expression of RAGE was clearly increased when G-HSA was present. Moreover, HLA-DR expression was upregulated together with RAGE expression, in the presence of G-HSA.

Previous reports have demonstrated that glycated albumin induces platelet aggregation and activation<sup>[28,29]</sup>. Therefore, we measured the expression of CD62P and CD41 surface molecules, which are markers of platelet activation and aggregation, respectively, in experiments where T cells were either cultured alone, or co-cultured with ASC, in the presence of PHA and G-HSA, or HSA. Whereas markers of platelet aggregation and activation increased in activated ASC/MNC co-cultures, no difference was observed whether G-HSA or HSA was present. ICAM-1 expression, which has also been shown to increase in endothelial cells under the influence of RAGE activation<sup>[30]</sup> and in co-cultures of obese ASC with T cells<sup>[31]</sup>, did not increase in the presence of G-HSA.

Therefore, these results suggested a specific effect of G-HSA on RAGE and HLA-DR expression in co-cultured cells.

### **Anti-RAGE mAb inhibits RAGE and HLA-DR expression in co-cultured cells**

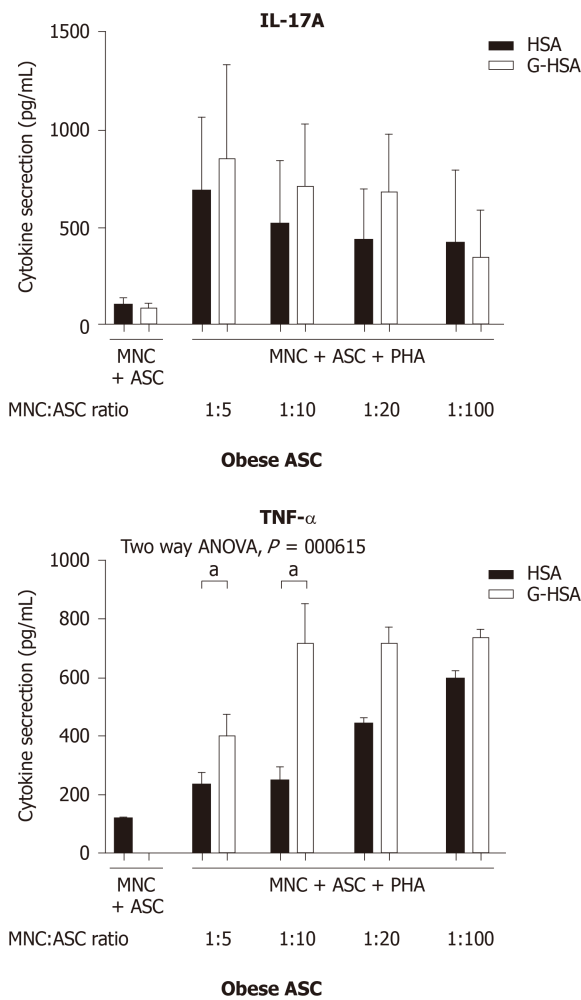
To better define the effects of G-HSA on RAGE and HLA-DR expression, we then added anti-RAGE mAb during co-cultures of lean ASC with MNC for 48 h, and measured the expression of RAGE, HLA-DR, CD41, CD62P and ICAM-1. As expected, RAGE expression decreased. Among the other molecules that were analyzed, only HLA-DR expression decreased down to the levels of cells co-cultured in the presence of HSA.

### **Specific inhibitory effects of anti-RAGE mAb on ASC-mediated IL-17A production**

Because the anti-RAGE antibody was able to inhibit RAGE and HLA-DR expression, we then investigated whether anti-RAGE mAb could inhibit IL-17A production. Therefore, co-cultures of PHA-activated ASC/MNC cells were performed in the presence or absence of anti-RAGE mAb. Results showed that IL-17A secretion significantly decreased in the presence of anti-RAGE mAb ( $P = 0.0402$  in paired  $t$  tests), but not IFN $\gamma$ , nor TNF $\alpha$ , although a trend was observed for the latter. Therefore, our results suggested that RAGE might be specifically implicated in lean ASC-mediated IL-17A production, but not in IFN $\gamma$  or TNF $\alpha$  secretion.

## **DISCUSSION**

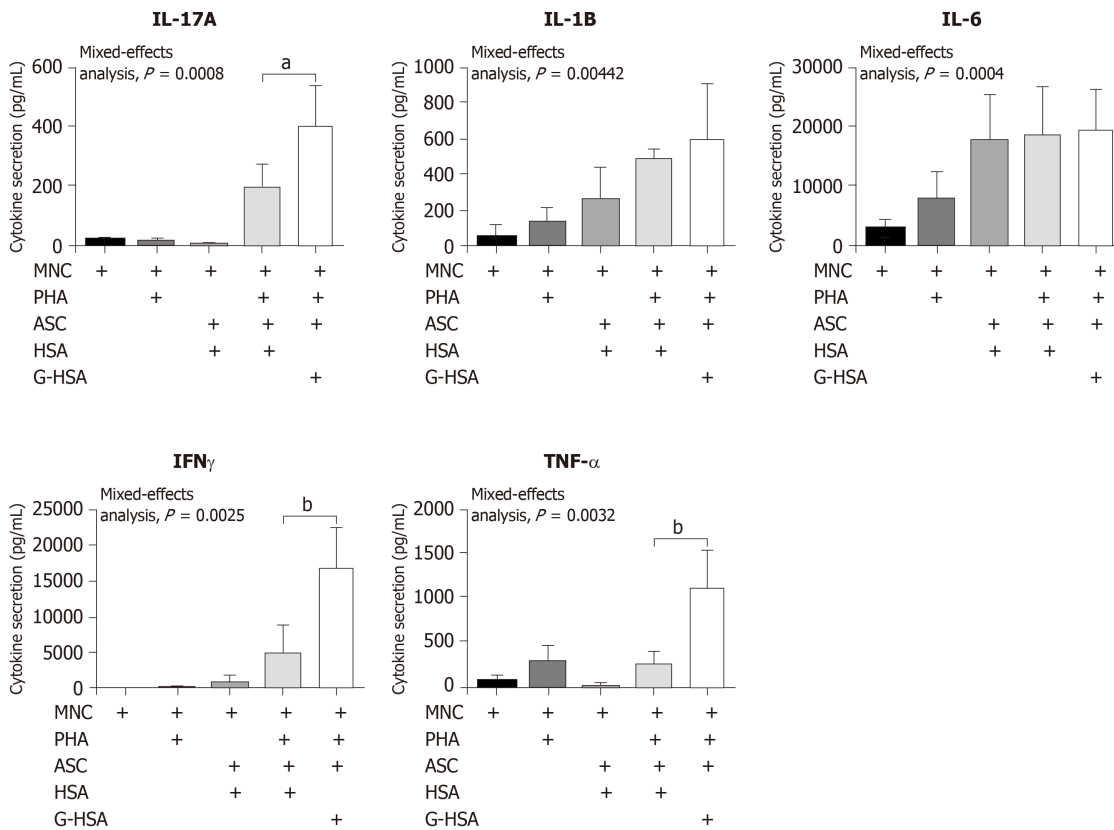
IL-17A/F are pro-inflammatory cytokines known to play an important role in AT-low grade inflammation in obese individuals, possibly leading to T2D<sup>[25,32-36]</sup>. Interestingly, IL-17A/F cytokines have also been involved in the pathogenicity of T1D<sup>[37]</sup>, notably through their peri-pancreatic fat location<sup>[38,39]</sup>. Indeed, deletion of sentrin-specific protease 1 (SEN1), a SUMO-specific protease in AT, resulted in activating NFKB and pro-inflammatory cytokine/chemokine secretion in peri-pancreatic AT, ultimately leading to the recruitment of immune cells, including Th17 cells<sup>[38]</sup>. Subsequent to induced beta cell death and pancreatic disruption, spontaneous development of T1D was further observed in these SEN1-invalidated mice<sup>[39]</sup>. Strengthening the potential role of pancreatic fat as a pathogenic factor leading to beta cell dysfunction is the demonstration that pancreatic fat has been negatively associated with insulin secretion in individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance<sup>[40]</sup>. Moreover in this study, pancreatic fat was found to be a stronger determinant of impaired insulin secretion than visceral fat<sup>[40]</sup>. In the present study, we investigated whether AGE could be involved in the dysfunction of lean AT, through increase of IL-17A production by T cells interacting with adipocyte progenitors. To address this question, we used the co-culture model that we have previously reported to lead to Th17 cell activation by ASC<sup>[25]</sup>, and added low concentrations of HSA or G-HSA. When using obese ASC, we observed only a weak, but not significant effect of G-HSA on increased IL-17A production, suggesting other mechanisms than AGE in obese-ASC-mediated IL-17A secretion (Figure 1). However, when lean ASC/MNC co-cultures



**Figure 1 Glycated human serum albumin increases the levels of interleukin 17A promoted by obese adipose-derived stem cells, at suboptimal conditions.** Graded concentrations of obese adipose-derived stem cells (ASC) were co-cultured in the presence of mononuclear cells (MNC) at different ratios of 1:5, 1:10, 1:20, or 1:100, with 20000 ASC for 100000 MNC. Co-cultures were activated by phytohemagglutinin A (5  $\mu$ g/mL) for 48 h in the presence of 1% human serum albumin or 1% glycated human serum albumin. ELISA were performed to measure interleukin-17A production and tumor necrosis factor alpha. Bars represent the mean  $\pm$  SE of 4 independent experiments performed in triplicates. The  $P$  value shown in the figure corresponds to ANOVA multivariate analysis results, and <sup>a</sup> $P < 0.05$ , as obtained by Bonferroni post-hoc tests. ASC: Adipose-derived stem cells; MNC: Mononuclear cells; PHA: Phytohemagglutinin A; HSA: Human serum albumin; G-HSA: Glycated human serum albumin; IL: Interleukin; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha.

were incubated in the presence of 1% G-HSA, a significant increase of IL-17A production was observed, together with increased IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  production. This increase was probably related to specific activation of T cells by G-HSA, as neither IL-1 $\beta$  nor IL-6 significantly increase (Figure 2).

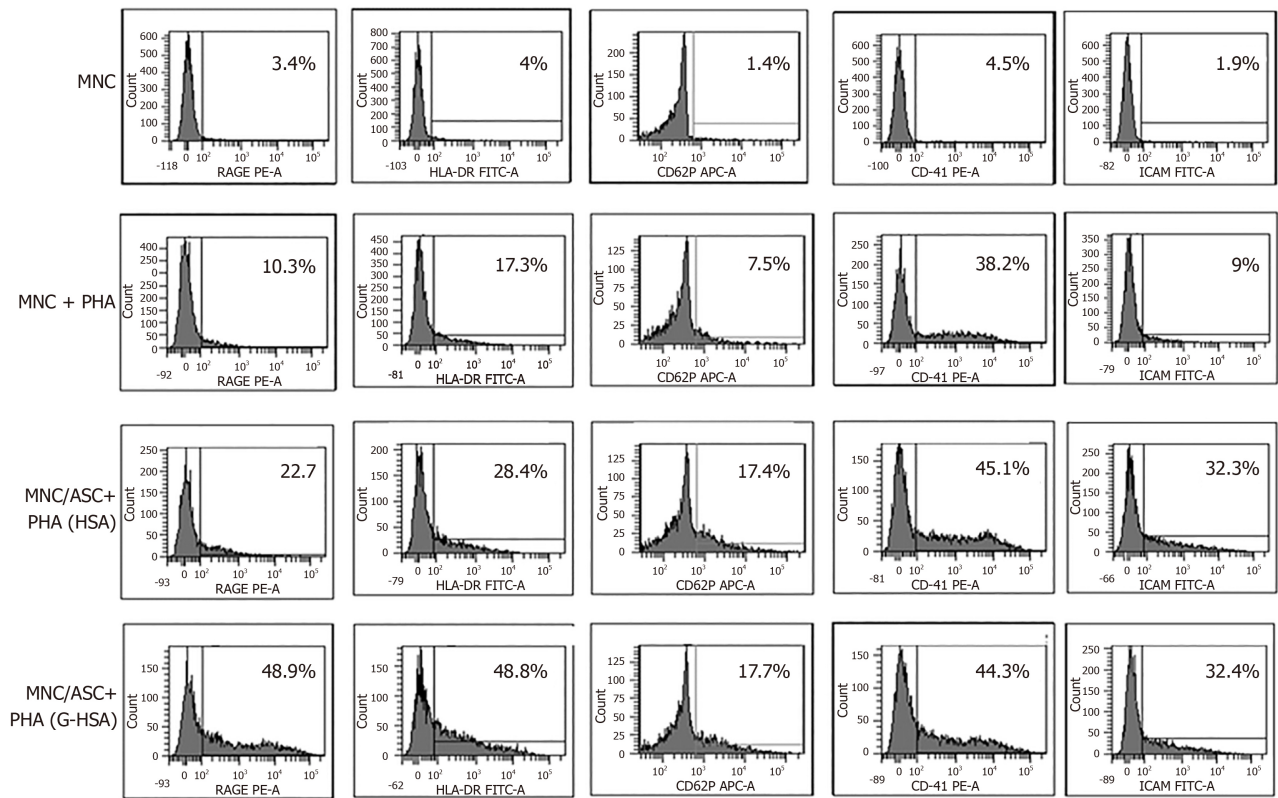
RAGE is one of the AGE receptors and has been widely implicated in most of the pro-inflammatory mechanisms mediated by AGE and leading to chronic inflammation disorders. They are constitutively expressed in T cells from diabetic patients, and are known to activate the NF $\kappa$ B pathway leading to inflammatory cytokine production<sup>[15]</sup>. However, not all T cells are regulated by RAGE, as shown by Chen *et al*<sup>[20]</sup> who demonstrated a differential effect of RAGE blockade on splenic T cells but not on fully activated T cells in a transfer model of diabetes. Supporting these results, we also demonstrated herein that RAGE was involved in Th17 cell, but not Th1 cell activation, since only IL-17A secretion was inhibited by anti-RAGE mAb (Figure 5). A similar differential effect of RAGE on IL-17A and TNF $\alpha$  production was also observed in T1D, where RAGE positive T cells were found to express higher levels of IL-17A but not TNF $\alpha$  nor IFN $\gamma$ , as compared with RAGE negative cells in the same patients. This demonstrated thus a potentiating effect of RAGE signaling pathway on IL-17A production<sup>[22]</sup>. Confirming the implication of RAGE in ASC-mediated T cell activation, we observed increased RAGE expression, together with HLA-DR expression when G-HSA was added to the co-cultures, and an abolition of this effect in the presence of RAGE mAb which concomitantly resulted in inhibition of IL-17A production (Figures 4 and 5). Finally, although glycated albumin has been shown to increase platelet



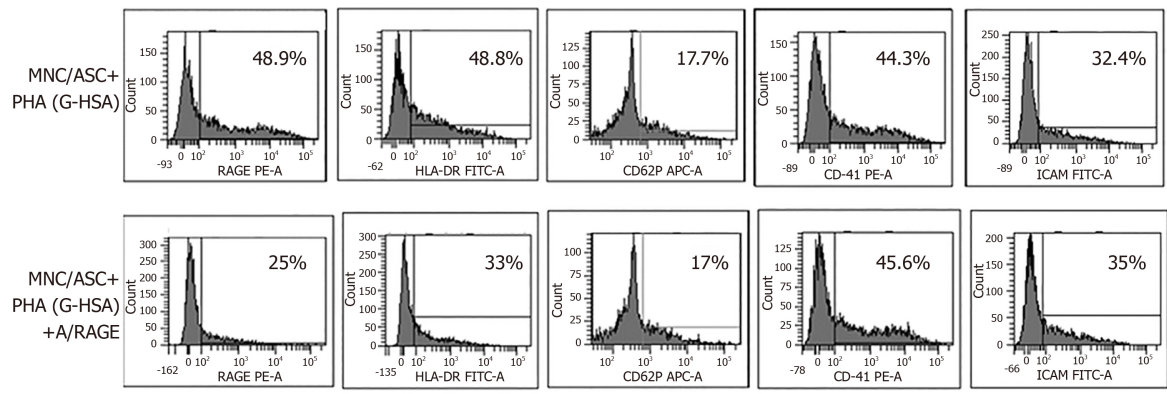
**Figure 2 Lean adipose-derived stem cells increase the levels of interleukin 17A, tumor necrosis factor alpha, and interferon gamma secretion by mononuclear cells, in the presence of glycated human serum albumin.** Lean adipose-derived stem cells (ASC) were co-cultured with mononuclear cells (MNC) at the 1:5 ASC to MNC cell ratio, in the presence of 1% glycated human serum albumin or human serum albumin (HSA) for 48 h, phytohemagglutinin A (PHA) was added or not at 5  $\mu$ g/mL. As control, MNC were cultured alone in the presence of PHA or not, and HSA. ELISA were performed to measure interleukin (IL)-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, interferon gamma, and tumor necrosis factor alpha production. Bars represent the mean  $\pm$  SE of 5 independent experiments performed in triplicates. The *P* values shown in the figure correspond to ANOVA multivariate results and <sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01, respectively as obtained by Bonferroni post-hoc tests. ASC: Adipose-derived stem cells; MNC: Mononuclear cells; G-HSA: Glycated human serum albumin; HSA: Human serum albumin; PHA: Phytohemagglutinin A; IL: Interleukin; IFN $\gamma$ : Interferon gamma; TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha.

aggregation<sup>[28,29]</sup>, we did not find its involvement in AGE-mediated activation of T cell secretion. Indeed, up-regulation of CD41 and CD62P expression, two markers of platelet aggregation and activation respectively, did not further increase in the presence of G-HSA (Figure 3). Moreover, RAGE mAb did not inhibit the expression of these two markers, either (Figure 4). ICAM-1 expression, which has been shown to be up-regulated by AGE in other cell models<sup>[41]</sup>, did not increase in the presence of AGE, and was not inhibited by RAGE mAb (Figures 3 and 4). Therefore, we concluded that in our model platelet aggregation and ICAM-1 were not involved in the potentiation of Th17 cytokines production by G-HSA.

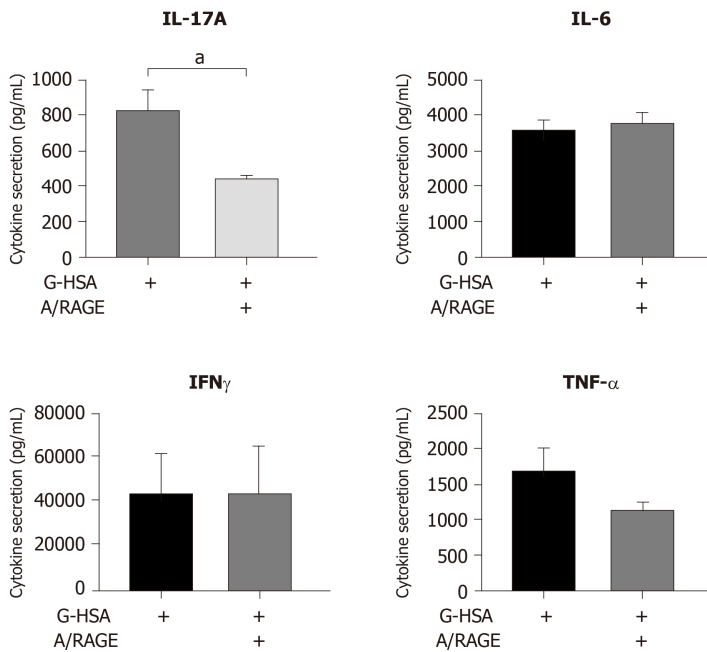
In conclusion, we have shown herein that the presence of G-HSA enhances lean ASC-mediated IL-17A production through a mechanism requiring RAGE signaling. Moreover, our study suggests a new mechanism by which ASC could contribute to inflammatory processes through AGE-mediated IL-17A production in AT of lean individuals. This could be potentially of importance in the context of T1D pathophysiology.



**Figure 3 Glycated human serum albumin increases receptor for advanced glycated end products and human leukocyte antigen-DR expression in adipose-derived stem cell / mononuclear cell co-cultures.** Lean adipose-derived stem cells (ASC) were co-cultured with mononuclear cells (MNC) at the 1:5 ASC to MNC cell ratio, in the presence of 1% glycated human serum albumin or human serum albumin (HSA) for 48 h, phytohemagglutinin A (PHA) was added or not. As control MNC were cultured alone in the presence or not of PHA, and HSA. Human leukocyte antigen-DR, receptor for advanced glycated end products, cluster of differentiation (CD) 41, CD62P, and intercellular adhesion molecule 1 were stained with fluorescent-conjugated antibodies, and analyzed by cytofluorometry, using the DIVA software. This experiment is representative of two experiments performed, with two different ASC. ASC: Adipose-derived stem cells; MNC: Mononuclear cells; G-HSA Glycated human serum albumin; HSA: Human serum albumin; PHA: Phytohemagglutinin A; HLA: Human leukocyte antigen; RAGE: Receptor for advanced glycated end products; CD: Cluster of differentiation; ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1; FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE: Phycoerythrin; APC: Allophycocyanin.



**Figure 4 Anti-receptor for advanced glycated end products monoclonal antibody inhibits receptor for advanced glycated end products and human leukocyte antigen-DR expression.** Lean adipose-derived stem cells (ASC) were co-cultured with mononuclear cells (MNC) at the 1:5 ASC to MNC cell ratio, in the presence of 1% glycated human serum albumin for 48 h, phytohemagglutinin A was added at 5 µg/mL. Anti-receptor for advanced glycated end products (RAGE) monoclonal antibody was added at a concentration of 20 µg/mL. cluster of differentiation (CD) 41, CD62P, intercellular adhesion molecule 1, human leukocyte antigen-DR, and RAGE expression were stained with fluorescent-conjugated antibodies and analyzed by cytofluorometry, using the DIVA software. This experiment is representative of two experiments performed with two different ASC. ASC: Adipose-derived stem cells; MNC: Mononuclear cells; G-HSA: Glycated human serum albumin; PHA: Phytohemagglutinin A; RAGE: Receptor for advanced glycated end products; mAb: Monoclonal antibody; CD: Cluster of differentiation; ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1; HLA: Human leukocyte antigen; FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE: Phycoerythrin; APC: Allophycocyanin.



**Figure 5 Inhibitory effects of anti-receptor for advanced glycated end products monoclonal antibody on interleukin 17A production.** Lean adipose-derived stem cells (ASC) were co-cultured with mononuclear cells (MNC) at the 1:5 ASC to MNC cell ratio, in the presence of 1% glycated human serum albumin for 48 h, phytohemagglutinin A was added. Anti-receptor for advanced glycated end products monoclonal antibody was added at a concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . ELISA were performed to measure interleukin (IL)-17A, interferon gamma, tumor necrosis factor alpha and IL-6 secretion. Bars represent the mean  $\pm$  SE of 5 independent experiments performed in triplicates. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , as obtained by paired *t* tests. ASC: Adipose-derived stem cells; MNC: Mononuclear cells; G-HSA: Glycated human serum albumin; PHA: Phytohemagglutinin A; RAGE: Receptor for advanced glycated end products; mAb: Monoclonal antibody; IL: Interleukin; IFN $\gamma$ : Interferon gamma; TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha.

## ARTICLE HIGHLIGHTS

### Research background

Advanced glycation end products (AGE) are involved in type 1 diabetes (T1D) through reduction of glucose uptake and attenuation of insulin sensitivity. Moreover, AGE are known to promote interleukin (IL)-17A secreting T cells.

### Research motivation

Adipose Tissue (AT), and especially pancreatic AT is a pathogenic factor leading to beta cell destruction partly due to IL-17A secreting T helper (Th17) cell recruitment; IL-17A/F are pro-inflammatory cytokines known to play an important role in AT-low grade inflammation and propagation of inflammation outside AT.

### Research objectives

We have previously shown that adipose-derived stem cells (ASC) promote Th17 cells in obese AT, but not or less in lean AT. Here, we investigated whether AGE could improve lean ASC ability to promote IL-17A production by T cells.

### Research methods

With this aim, we cocultured ASC from lean AT with mononuclear cells in the presence of glycated human serum albumin (G-HSA) or human serum albumin. We then analyzed the influence of AGE by blocking their ability to bind to receptor of advanced glycation end products (RAGE). IL-17A and other pro-inflammatory cytokine secretions were measured, together with surface expression of RAGE, and other relevant molecules.

### Research results

We have demonstrated herein that G-HSA enhances IL-17A, interferon gamma and tumor necrosis factor alpha secretion by MNC in the presence of ASC harvested from lean individuals. This effect involves the RAGE/AGE axis as assessed by anti-RAGE blocking monoclonal antibodies (mAb) and is associated with increased expression of RAGE and human leukocyte antigen-DR molecules.

### Research conclusions

Thus, our results demonstrate that G-HSA is able to improve lean ASC-mediated IL-17A production in AT, suggesting a new mechanism by which AGE could contribute to T1D pathophysiology.

### Research perspectives

Here we propose a mechanism by which AT can lead to the recruitment of Th17 cells in lean individuals through activation of the AGE/RAGE axis. Because pancreatic fat has been involved in the pathogenicity of T1D, this model deserves to be validated in animal studies, in order to evaluate the efficacy of RAGE blocking mAb as a therapeutic tool.

---

## ACKNOWLEDGEMENTS

---

We wish to thank Yassine Corbin, for his help in English editing corrections.

---

## REFERENCES

---

- Rondeau P**, Navarra G, Cacciabaudo F, Leone M, Bourdon E, Militello V. Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1804**: 789-798 [PMID: 20006741 DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.12.003]
- Vlassara H**. Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment. *Ann N Y Acad Sci* 2005; **1043**: 452-460 [PMID: 16037266 DOI: 10.1196/annals.1333.051]
- Ulrich P**, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 2001; **56**: 1-21 [PMID: 11237208 DOI: 10.1210/rp.56.1.1]
- Castellani R**, Smith MA, Richey PL, Perry G. Glycooxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Res* 1996; **737**: 195-200 [PMID: 8930366 DOI: 10.1016/0006-8993(96)00729-9]
- Jeffcoate SL**. Diabetes control and complications: the role of glycated haemoglobin, 25 years on. *Diabet Med* 2004; **21**: 657-665 [PMID: 15209755 DOI: 10.1046/j.1464-5491.2003.01065.x]
- Arasteh A**, Farahi S, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi AA. Glycated albumin: an overview of the In Vitro models of an In Vivo potential disease marker. *J Diabetes Metab Disord* 2014; **13**: 49 [PMID: 24708663 DOI: 10.1186/2251-6581-13-49]
- Hashimoto K**, Osugi T, Noguchi S, Morimoto Y, Wasada K, Imai S, Waguri M, Toyoda R, Fujita T, Kasayama S, Koga M. A1C but not serum glycated albumin is elevated because of iron deficiency in late pregnancy in diabetic women. *Diabetes Care* 2010; **33**: 509-511 [PMID: 20032277 DOI: 10.2337/dc09-1954]
- Yoshiuchi K**, Matsuhisa M, Katakami N, Nakatani Y, Sakamoto K, Matsuoka T, Umayahara Y, Kosugi K, Kaneto H, Yamasaki Y, Hori M. Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobin in type 1 and type 2 diabetes. *Endocr J* 2008; **55**: 503-507 [PMID: 18445997 DOI: 10.1507/endocrj.k07e-089]
- Nagayama H**, Inaba M, Okabe R, Emoto M, Ishimura E, Okazaki S, Nishizawa Y. Glycated albumin as an improved indicator of glycemic control in hemodialysis patients with type 2 diabetes based on fasting plasma glucose and oral glucose tolerance test. *Biomed Pharmacother* 2009; **63**: 236-240 [PMID: 18538530 DOI: 10.1016/j.biopha.2008.04.002]
- Wautier JL**, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 7742-7746 [PMID: 8052654 DOI: 10.1073/pnas.91.16.7742]
- Schmidt AM**, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001; **108**: 949-955 [PMID: 11581294 DOI: 10.1172/JCI14002]
- Neeper M**, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14998-15004 [PMID: 1378843]
- Wautier MP**, Guillausseau PJ, Wautier JL. Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health. *Diabetes Metab Syndr* 2017; **11**: 305-309 [PMID: 27612394 DOI: 10.1016/j.dsx.2016.09.009]
- Ishihara K**, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett* 2003; **550**: 107-113 [PMID: 12935895 DOI: 10.1016/s0014-5793(03)00846-9]
- Cohen MP**, Shea E, Chen S, Shearman CW. Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-beta 1 production in macrophage RAW cells. *J Lab Clin Med* 2003; **141**: 242-249 [PMID: 12677169 DOI: 10.1067/mlc.2003.27]
- Yeh CL**, Hu YM, Liu JJ, Chen WJ, Yeh SL. Effects of supplemental dietary arginine on the exogenous advanced glycosylation end product-induced interleukin-23/interleukin-17 immune response in rats.

- Nutrition* 2012; **28**: 1063-1067 [PMID: 22673595 DOI: 10.1016/j.nut.2012.01.014]
- 17 **Wautier JL**, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 1996; **97**: 238-243 [PMID: 8550841 DOI: 10.1172/JCI118397]
  - 18 **Xu X**, Li Z, Luo D, Huang Y, Zhu J, Wang X, Hu H, Patrick CP. Exogenous advanced glycosylation end products induce diabetes-like vascular dysfunction in normal rats: a factor in diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; **241**: 56-62 [PMID: 12545293 DOI: 10.1007/s00417-002-0575-7]
  - 19 **Zhou G**, Li C, Cai L. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway. *Am J Pathol* 2004; **165**: 2033-2043 [PMID: 15579446 DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63254-3]
  - 20 **Chen Y**, Yan SS, Colgan J, Zhang HP, Luban J, Schmidt AM, Stern D, Herold KC. Blockade of late stages of autoimmune diabetes by inhibition of the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 2004; **173**: 1399-1405 [PMID: 15240736 DOI: 10.4049/jimmunol.173.2.1399]
  - 21 **Durning SP**, Preston-Hurlburt P, Clark PR, Xu D, Herold KC; Type 1 Diabetes TrialNet Study Group. The Receptor for Advanced Glycation Endproducts Drives T Cell Survival and Inflammation in Type 1 Diabetes Mellitus. *J Immunol* 2016; **197**: 3076-3085 [PMID: 27655844 DOI: 10.4049/jimmunol.1600197]
  - 22 **Akirav EM**, Preston-Hurlburt P, Garyu J, Henegariu O, Clynes R, Schmidt AM, Herold KC. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PLoS One* 2012; **7**: e34698 [PMID: 22509345 DOI: 10.1371/journal.pone.0034698]
  - 23 **Gaffen SL**. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 556-567 [PMID: 19575028 DOI: 10.1038/nri2586]
  - 24 **Song X**, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine* 2013; **62**: 175-182 [PMID: 23557798 DOI: 10.1016/j.cyto.2013.03.014]
  - 25 **Eljaafari A**, Robert M, Chehimi M, Chanon S, Durand C, Vial G, Bendridi N, Madec AM, Disse E, Laville M, Rieusset J, Lefai E, Vidal H, Pirola L. Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. *Diabetes* 2015; **64**: 2477-2488 [PMID: 25765019 DOI: 10.2337/db15-0162]
  - 26 **Chehimi M**, Robert M, Bechwaty ME, Vial G, Rieusset J, Vidal H, Pirola L, Eljaafari A. Adipocytes, like their progenitors, contribute to inflammation of adipose tissues through promotion of Th-17 cells and activation of monocytes, in obese subjects. *Adipocyte* 2016; **5**: 275-282 [PMID: 27617173 DOI: 10.1080/21623945.2015.1134402]
  - 27 **Bourin P**, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013; **15**: 641-648 [PMID: 23570660 DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006]
  - 28 **Rubenstein DA**, Yin W. Glycated albumin modulates platelet susceptibility to flow induced activation and aggregation. *Platelets* 2009; **20**: 206-215 [PMID: 19437339 DOI: 10.1080/09537100902795492]
  - 29 **Soaita I**, Yin W, Rubenstein DA. Glycated albumin modifies platelet adhesion and aggregation responses. *Platelets* 2017; **28**: 682-690 [PMID: 28067098 DOI: 10.1080/09537104.2016.1260703]
  - 30 **Basta G**, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 2004; **63**: 582-592 [PMID: 15306213 DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.05.001]
  - 31 **Chehimi M**, Ward R, Pestel J, Robert M, Pesenti S, Bendridi N, Michalski MC, Laville M, Vidal H, Eljaafari A. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit IL-17A Secretion through Decreased ICAM-1 Expression in T Cells Co-Cultured with Adipose-Derived Stem Cells Harvested from Adipose Tissues of Obese Subjects. *Mol Nutr Food Res* 2019; **63**: e1801148 [PMID: 30848861 DOI: 10.1002/mnfr.201801148]
  - 32 **Fabbri E**, Cella M, McCartney SA, Fuchs A, Abumrad NA, Pietka TA, Chen Z, Finck BN, Han DH, Magkos F, Conte C, Bradley D, Fraterrigo G, Eagon JC, Patterson BW, Colonna M, Klein S. Association between specific adipose tissue CD4<sup>+</sup> T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* 2013; **145**: 366-374. e1-3 [PMID: 23597726 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.04.010]
  - 33 **McLaughlin T**, Liu LF, Lamendola C, Shen L, Morton J, Rivas H, Winer D, Tolentino L, Choi O, Zhang H, Hui Yen Chng M, Engleman E. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; **34**: 2637-2643 [PMID: 25341798 DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304636]
  - 34 **Dalmas E**, Venteclef N, Caer C, Poitou C, Cremer I, Aron-Wisnewsky J, Lacroix-Desmazes S, Bayry J, Kaveri SV, Clément K, André S, Guerre-Millo M. T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2014; **63**: 1966-1977 [PMID: 24520123 DOI: 10.2337/db13-1511]
  - 35 **Bertola A**, Ciucci T, Rousseau D, Bourlier V, Duffaut C, Bonnafous S, Blin-Wakkach C, Anty R, Iannelli A, Gugenheim J, Tran A, Bouloumié A, Gual P, Wakkach A. Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 2012; **61**: 2238-2247 [PMID: 22596049 DOI: 10.2337/db11-1274]
  - 36 **Chehimi M**, Vidal H, Eljaafari A. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. *J Clin Med* 2017; **6**: 68 [PMID: 28708082 DOI: 10.3390/jcm6070068]
  - 37 **Abdel-Moneim A**, Bakery HH, Allam G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* 2018; **101**: 287-292 [PMID: 29499402 DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.103]
  - 38 **Shao L**, Feng B, Zhang Y, Zhou H, Ji W, Min W. The role of adipose-derived inflammatory cytokines in type 1 diabetes. *Adipocyte* 2016; **5**: 270-274 [PMID: 27617172 DOI: 10.1080/21623945.2016.1162358]
  - 39 **Shao L**, Zhou HJ, Zhang H, Qin L, Hwa J, Yun Z, Ji W, Min W. SENP1-mediated NEMO deSUMOylation in adipocytes limits inflammatory responses and type-1 diabetes progression. *Nat Commun* 2015; **6**: 8917

[PMID: 26596471 DOI: 10.1038/ncomms9917]

- 40 **Heni M**, Machann J, Staiger H, Schwenger NF, Peter A, Schick F, Claussen CD, Stefan N, Häring HU, Fritsche A. Pancreatic fat is negatively associated with insulin secretion in individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance: a nuclear magnetic resonance study. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; **26**: 200-205 [PMID: 20225188 DOI: 10.1002/dmrr.1073]
- 41 **Basta G**, Lazzarini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 2002; **105**: 816-822 [PMID: 11854121 DOI: 10.1161/hc0702.104183]



## Article 4

**Les cellules souches adipocytaires induisent une surexpression de PD-L1 dans le tissu adipeux blanc des sujets obèses, aboutissant à la dysfonction des lymphocytes T.**

Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediate PD-L1 Overexpression in the White Adipose Tissue of Obese Individuals, Resulting in T Cell Dysfunction.

*Assia Eljaafari, **Julien Pestel**, Brigitte Le Magueresse-Battistoni, Stephanie Chanon, Julia Watson, Maud Robert, Emmanuel Disse, Hubert Vidal.*

Cells, 2021.

## **Rôle des points de contrôle immuns dans l'inflammation médiée par les CSA du tissu adipeux obèse**

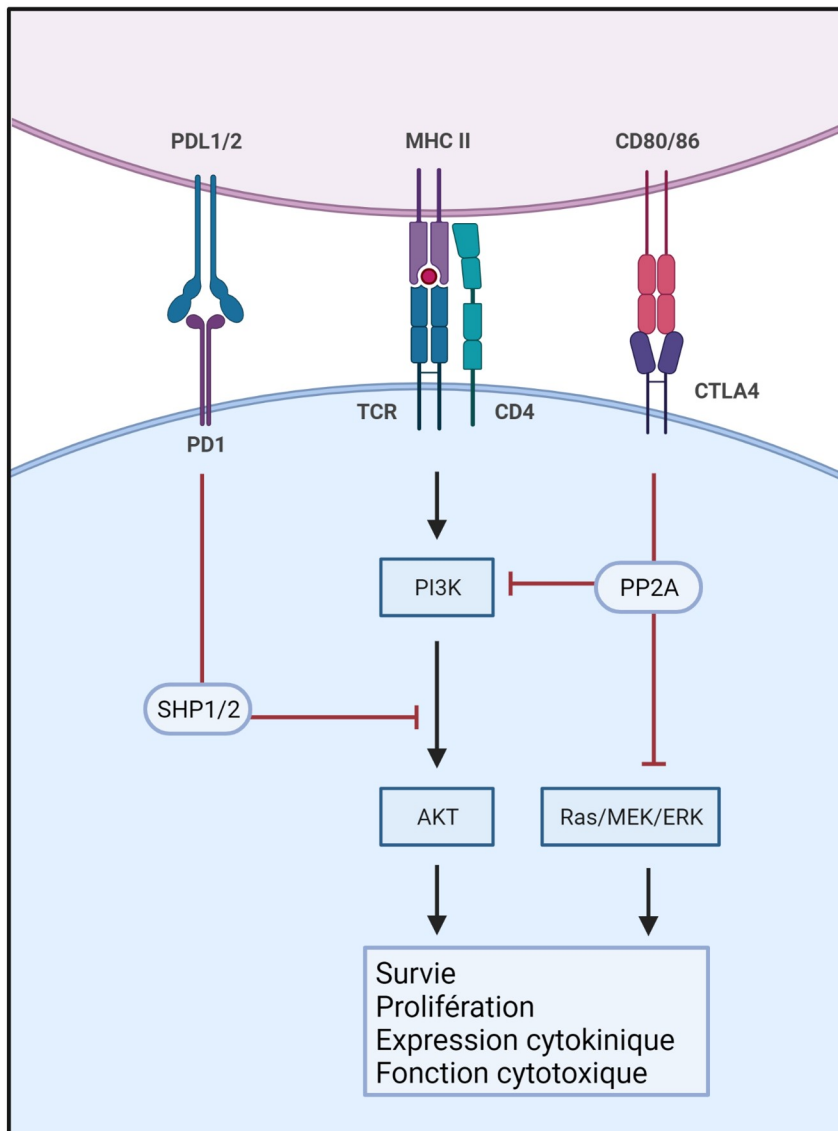
### Rôle des points de contrôle immuns

Les lymphocytes T du système immunitaire adaptatif tout comme les cellules NK, sont capables de reconnaître et de détruire les cellules présentant un antigène microbien ou tumoral. Pour ce qui concerne les lymphocytes T, la détection de ces cellules fait suite à l'interaction du TCR, présent sur les lymphocytes T, avec le couple CMH-peptide présent sur les cellules présentatrices ou tumorales. Cependant, l'activation d'un lymphocyte T nécessite également un signal de co-stimulation. Il existe également des signaux inhibiteurs dont les points de contrôles immuns. Ces différents signaux permettent de réguler cette réponse immunitaire et de protéger l'organisme contre l'activation de lymphocytes T auto-réactifs, pour limiter les dommages tissulaires et maintenir la tolérance vis-à-vis du soi. Cependant les points de contrôles immuns induits dans des situations aiguës diminuent rapidement, alors qu'ils restent présents dans des situations d'infection chroniques ou tumorales.

Parmi les différents points de contrôles immuns, la voie PD-1/PD-L1 est la plus puissante, du fait de son implication dans de nombreux types de tumeurs. La « Programmed cell death protein 1 » (PD-1 ou PDCD1) est exprimée à la surface des lymphocytes T (Ishida et al., 1992). PD-1 se lie au « Programmed death-ligand 1 ou 2 » (PD-L1/PDL2), PD-L1 et PD-L2 correspondent au CD274 et CD273, respectivement. PD-L2 est exprimé par les macrophages, les DC et les mastocytes. PD-L1 quant à lui, est exprimé en condition inflammatoire par les cellules issues de la lignée lymphoïde, les macrophages, les DC, les mastocytes mais également par des cellules non hématopoïétiques telles que les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les cellules cancéreuses (Nirschl and Drake, 2013). L'interaction entre PD-1 et PD-L1 peut induire plusieurs dysfonctionnements des lymphocytes T : une anergie, une inhibition de leur prolifération, de leur survie, de leur production cytokinique et/ou de leur fonction cytotoxique (pour les CD8+ et NK). Par exemple, dans le cas

de certaines tumeurs, les cellules cancéreuses exprimant PD-L1 induisent une inhibition de l'activation des lymphocytes T. Ceci aboutit à l'anergie des lymphocytes T et à la survie des cellules cancéreuses. Le système immunitaire n'est alors plus capable de détecter ces cellules comme des cellules aberrantes (Chen and Han, 2015). En 2018, le succès de l'immunothérapie dirigée contre les points de contrôles immuns exprimés notamment par les cellules cancéreuses, a permis à ses découvreurs, James Allison et Tasuku Honjo, d'obtenir le prix Nobel de médecine. Actuellement, plus de 2000 essais cliniques utilisent l'immunothérapie contre les cancers, notamment les mélanomes (Carlino et al., 2021), les carcinomes rénaux (Canales Rojas, 2021), les lymphomes Hodgkinien ou encore les cancers de la vessie (Roviello et al., 2021). De plus au cours des infections virales aiguës, il a été démontré que PD-1 est exprimé de manière transitoire afin de réguler les fonctions des cellules T (Barber et al., 2006). Cependant, lors de l'infection chronique par le LCMV ou le VIH, il a été démontré que des niveaux élevés de PD-1 se maintenaient dans le temps et contribuaient à l'épuisement des cellules T et à l'immunodépression (Saeidi et al., 2018). A l'inverse, la délétion génique de PD-1 chez des souris aboutit au développement de maladies auto-immunes telles que le lupus (Nishimura et al., 1999), ou le diabète de type I (Wang et al., 2005). L'engagement de PD-1 et PD-L1 induit également une modification du métabolisme des lymphocytes, avec une diminution de l'activité glycolytique aérobie diminuant la polarisation et les fonctions effectrices des Th1 et Th17 (Chang et al., 2013), vers l'utilisation de la  $\beta$ -oxydation qui favorise les Tregs (Patsoukis et al., 2015).

La « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » (CTLA-4) est capable de se lier aux molécules de co-stimulation CD80 et 86 ou B7-1/B7-2. Elle constitue un second point de contrôle immun majeur. CTLA-4 une fois liée aux molécules CD80 et CD86 induit un blocage du signal de co-stimulation qui a normalement lieu entre CD80/86 et CD28. CTLA-4 possède un rôle majeur dans la tolérance au soi, puisque la délétion génique de CTLA-4 chez des souris induit le développement rapide, entre 2 à 4 semaines après la naissance, d'une maladie inflammatoire multi-organes (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995). De même chez l'Homme, les individus hétérozygotes pour CTLA-4 présentent une hyperactivation des lymphocytes T, une infiltration lymphocytaire importante dans les tissus et organes et une forte augmentation de lymphocyte B autoréactifs (Kuehn et al., 2014). CTLA4 est exprimée par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ après activation, néanmoins elle est exprimée de façon constitutive par les lymphocytes Tregs (Takahashi et al., 2000). Elle a également été décrite



**Figure 25 : Actions inhibitrices des checkpoints CTLA-4 et PD-1/PD-L1.**

comme exprimée par les lymphocytes B (Pioli et al., 2000), les DC, les monocytes (Wang et al., 2002), les granulocytes, ou encore les fibroblastes placentaires (Kaufman et al., 1999). L'activation de CTLA4 inhibe la prolifération, la progression du cycle cellulaire et la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T (Walunas et al., 1996, 1994). De plus, l'utilisation d'anticorps bloquant ou de modèles de souris délétées en CTLA4 a permis de montrer une augmentation de la polarisation des lymphocytes T naïfs vers des lymphocytes Th2 ou Th17 (Bour-Jordan et al., 2003; Ying et al., 2010). La liaison de CD80/86 sur CTLA4 induit au niveau de la cellule exprimant CTLA-4, le recrutement de la sérine/thréonine phosphatase 2 (PP2A) inhibant l'activation de la voie de signalisation du TCR (Schildberg et al., 2016). En effet, cette dernière nécessite une cascade de phosphorylations de la PI3K et de l'Akt pour induire une production de cytokines, puis la prolifération et la survie cellulaire. Contrairement à la voie de signalisation PD-1/PD-L1 qui induit également le recrutement de phosphatases, les SHP2/1 inhibant l'activité PI3K ainsi que la signalisation Ras-MEK-ERK, CTLA-4 n'inhibe pas la signalisation Ras-MEK-ERK (**Figure 25**).

### Implications des points de contrôles immuns au cours de l'obésité

Comme nous l'avons vu, l'obésité est donc associée au développement d'une inflammation chronique de bas grade au sein du tissu adipeux, sang et organes périphériques. Néanmoins, un dysfonctionnement du système immunitaire a également été décrit. En effet, les patients atteints d'obésité présentent des taux d'infection plus importants, une cicatrisation retardée et une diminution de la réponse vaccinale (Martí et al., 2001). Cela peut être lié à différents mécanismes comme l'altération de l'architecture, de la fonction thymique et des organes lymphoïdes aboutissant à une diminution de la production de lymphocytes T naïfs et une diminution du nombre de lymphocytes T (Weitman et al., 2013). Une diminution du nombre de lymphocytes T mémoires est également observée au cours de l'obésité ainsi qu'une altération des réponses immunitaires notamment liée à une diminution des fonctions cytotoxique. Cette diminution de la fonction cytotoxique s'explique notamment par la réduction de la fréquence des lymphocytes T CD8+ et NK (Karlsson et al., 2010; Mori et al., 2006).

De plus, il a récemment été mis en évidence un épuisement des lymphocytes T périphériques chez la souris et chez l'Homme au cours de l'obésité, dû notamment à une augmentation de l'expression de PD-1 par les lymphocytes T du sang. Ceci a été démontré chez

des patients atteints de cancer en état d'obésité. (Z. Wang et al., 2019). Néanmoins, le rôle de PD-1 dans le tissu adipeux au cours de l'obésité n'est pas encore clairement établi car contradictoire selon les études. Aussi, PD-1 participe à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes innés de type 2 (ILC2). Les ILC2 participent au maintien de l'homéostasie du tissu adipeux en promouvant la polarisation des lymphocytes Th2 et des macrophages M2. Or, il a été mis en évidence que la voie PD-1/PD-L1 participe à l'inhibition du nombre d'ILC2 au cours de l'obésité. Les auteurs ont mis en évidence que TNF $\alpha$  exprimé par le tissu adipeux induit la sécrétion d'IL-33 par les pré-adipocytes du tissu adipeux ce qui induit l'expression de PD-1 par les ILC2 qui à son tour va inhiber les inhiber. Le TNF $\alpha$  participe également à l'activation des macrophages M1 qui expriment fortement PD-L1. En inhibant la prolifération des ILC2, PD-1/PD-L1 participe à la dérégulation de l'homéostasie du tissu adipeux (Oldenhove et al., 2018). Dans une autre étude, les auteurs ont utilisé un modèle de souris délétées du gène de PD-L1 spécifiquement dans le tissu adipeux et ont montré un rôle protecteur des points de contrôles immuns. Cette délétion associée à un régime hypercalorique exacerbe l'infiltration macrophagique du tissu adipeux avec une augmentation des structures en couronne. De plus, l'insulino-résistance et le poids de ces souris ont largement augmentés par rapport aux souris sauvages (Wu et al., 2020). Les auteurs proposent donc un rôle du checkpoint PD-1/PD-L1 dans la modulation de l'inflammation chronique associée à l'obésité.

Enfin en ce qui concerne CTLA4, une étude a utilisé une protéine de fusion de CTLA4 qui se fixe à CD80/86 empêchant ainsi l'activation via CD28. Dans cette étude des souris soumises à un régime hypercalorique et traitées avec cette protéine, présentent une amélioration de la résistance à l'insuline ainsi qu'une diminution du poids corporel et du tissu adipeux, par rapport aux souris contrôles. Ceci est lié à l'induction d'une plus grande polarisation des monocytes en macrophages M2 au sein du tissu adipeux. De plus, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline a été observée et semble liée à l'augmentation de l'expression de l'adiponectine dans ces souris (Fujii et al., 2013).

Ces études contradictoires et encore peu nombreuses, ne permettent donc pas à l'heure actuelle de conclure sur l'effet négatif ou positif des points de contrôles immuns dans la régulation de l'inflammation du tissu adipeux.

## B. Résumé de l'article

La voie PD-1/PD-L1 est la plus puissante des points de contrôle immuns dans l'inhibition des réponses lymphocytaires. Elle est connue pour être activée par les cytokines inflammatoires ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ). En outre, l'obésité est associée à un dysfonctionnement immunitaire qui passe notamment par une diminution de la fréquence et de l'activité cytotoxique des lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  et NK. De plus, un épuisement accru des lymphocytes T en raison de l'augmentation d'expression continue de PD-1 a récemment été mis en évidence dans les lymphocytes T circulants des sujets en état d'obésité et atteints de cancer colorectaux et de mélanomes (Z. Wang et al., 2019). Comme le tissu adipeux blanc est connu pour initier l'inflammation à bas bruit chez les sujets en état d'obésité, nous avons suggéré dans cette étude que l'inflammation du tissu adipeux blanc pouvait également entraîner l'épuisement des lymphocytes T infiltrant ce tissu, au cours de l'obésité.

**- PD-L1 et PD-1 sont surexprimés dans le tissu adipeux des souris obèses.** En premier lieu, nous avons mesuré l'expression de PD-L1 et de PD-1 au sein du tissu adipeux blanc de souris rendues obèses par surnutrition, et nous avons observé une augmentation d'expression de PD-L1 et de PD-1 dans le tissu adipeux viscéral. Par contre, PD-L1 mais pas PD-1 a été surexprimé dans le tissu adipeux sous cutané des souris obèses ce qui pourrait être lié au fait que l'inflammation est connue pour augmenter préférentiellement dans le tissu adipeux viscéral par rapport au sous-cutané, au cours de l'obésité.

**- L'inflammation induite par les cellules souches adipocytaires d'origine obèse contribue à la surexpression de PD-L1.** Pour mieux analyser les mécanismes impliqués dans la surexpression de PD-L1, nous avons utilisé le modèle de co-culture CSA-CMN précédemment développé par notre équipe. Nous avons alors démontré que les CSA provenant du tissu adipeux de sujets obèses sont capables d'induire une surexpression de PD-L1 supérieure à celles provenant de sujets minces. Néanmoins, l'expression de PD-1 n'a pas été impactée par l'origine des CSA, mais seulement par l'activation par la PHA. Démontrant ainsi que les CSA induisent une surexpression maximale de PD-L1 lorsqu'elles sont issues de sujets obèse.

**- Le blocage de PD-L1 restaure en partie l'activation des lymphocytes Th1 et des Th17.** Dans notre modèle de co-culture, nous avons démontré que les CSA activent la voie Th17 et inhibe la voie Th1 ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-2). Afin d'évaluer l'effet de la surexpression de PD-L1 dans ce modèle, nous avons utilisé un anticorps neutralisant dirigé contre PD-L1. Ainsi le

blochage de PD-L1 a permis d'observer une augmentation d'expression du TNF $\alpha$  et de l'IL-2 (Th1) mais également de l'IL-17A et de l'IFN $\gamma$  (Th17). Par contre, l'expression d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$ , exprimés par les adipocytes et monocytes, n'a pas été pas modifiée, démontrant un effet spécifique de PD-L1 au niveau des lymphocytes T.

**- L'inflammation médiée par les CSAob induit une augmentation d'expression de PD-L1 par les adipocytes.** Pour évaluer l'effet de cette inflammation sur les adipocytes, nous avons cultivé des adipocytes fraîchement différenciés en présence du milieu conditionné issu des co-cultures CSA-CMN, activées par la PHA. Nous avons alors observé une forte augmentation d'expression de PD-L1 par les adipocytes. L'utilisation d'anticorps neutralisants anti-IFN $\gamma$  nous a permis de démontrer par la suite, que l'augmentation d'expression de PD-L1 au niveau des adipocytes était due à l'IFN $\gamma$ . Confirmant ce résultat, l'ajout d'IFN $\gamma$  recombinant mais pas l'IL-17A a induit une augmentation d'expression de PD-L1.

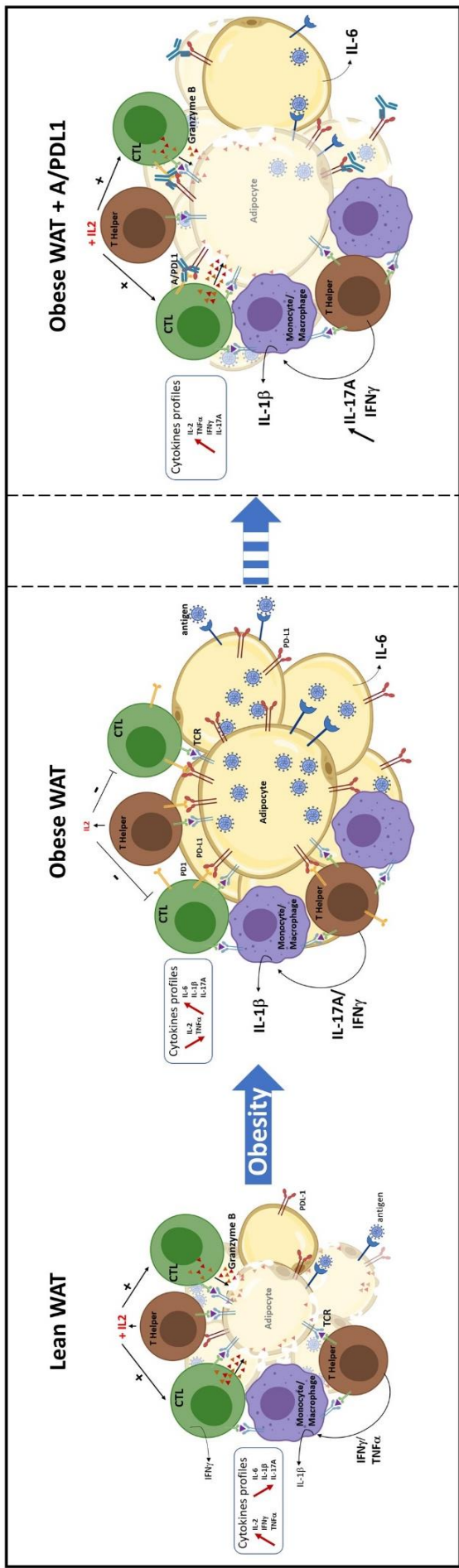
Pour conclure, cette étude a démontré que PD-L1 est surexprimé dans le tissu adipeux de sujets obèses en réponse à la sécrétion d'IFN $\gamma$ , ceci entraîne une diminution de l'activité cytotoxique des lymphocytes T. Il a été précédemment démontré que les adipocytes bruns et les lignées cellulaires différenciées 3T3 expriment PD-L1 (Ingram et al., 2017; Z. Li et al., 2020). Ici, nous avons démontré que les CSA (précurseurs des adipocytes) peuvent également surexprimer PD-L1 suite à l'interaction avec des CMN, en particulier lorsque les CSA ont été collectées au sein du tissu adipeux d'individus obèses. De plus, nous avons démontré que l'inflammation médiée par les co-cultures de CSAob et de CMN propage la surexpression de PD-L1 aux cellules présentes dans leur environnement, en particulier les adipocytes, sous l'influence de la sécrétion de l'IFN $\gamma$ . Cet effet de l'IFN $\gamma$  est en accord avec d'autres articles, dans lesquels le rôle de l'IFN $\gamma$  dans la surexpression de PD-L1 a été démontré, notamment au niveau des neutrophiles (Kleijn et al., 2013), de cellules épithéliales intestinales (Nakazawa et al., 2004), endothéliales (Mazanet and Hughes, 2002) et tumorales (Winterle et al., 2003). Il a été montré que de l'IFN $\gamma$  est capable d'induire l'épuisement des lymphocytes T notamment dans un modèle tumoral (Benci et al., 2019) démontrant un rôle régulateur de l'IFN $\gamma$  en plus de son rôle effecteur de la réponse inflammatoire. De plus, nos résultats suggèrent que l'inhibition de l'activation des lymphocytes Th1 observée dans notre modèle de co-culture est en partie liée à la surexpression de PD-L1. En effet, le blocage de PD-L1 restaure en partie la sécrétion de cytokines des lymphocytes Th1 (IL-2, TNF $\alpha$ ).

L'IL-2 est une cytokine qui joue un rôle majeur dans la maturation des lymphocytes T pré-cytotoxiques (pré-CTL) en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) afin de leur permettre d'exercer ultérieurement leur fonction cytotoxique (Kern et al., 1981). Notre équipe a précédemment rapporté que la présence de cellules souches mésenchymateuses inhibe la différenciation pré-CTL en cellules effectrices CTL du fait d'une inhibition d'IL-2, puisque cette inhibition a été levée par l'ajout d'IL-2 (Angoulvant et al., 2004). Ici, nos résultats suggèrent que les CSAob ont inhibé la maturation des pré-CTL en CTL via l'inhibition de l'expression d'IL-2. En effet, nous avons montré que la surexpression de PD-L1 induit une diminution d'expression d'IL-2, puisque son blocage restaure l'expression d'IL-2. De manière intéressante, l'activité cytotoxique des CTL a été réduite en présence d'adipocytes comparé aux adipocytes issus de CSA provenant de sujets minces. Nous l'avons montré via la diminution du marquage intracellulaire du Granzyme B, molécule impliquée dans la cytotoxicité des CTL. Ce résultat suggère que la propagation de la surexpression de PD-L1 vers les adipocytes, du fait de l'inflammation médiée par les CSA, pourrait inhiber l'activation des pré-CTL et la lyse des adipocytes hypertrophiques.

L'expression de PD-1, a augmenté suite à l'activation des CMN par la PHA, mais son expression n'a pas été modulée par la présence de CSA. Cela suggère que PD-1 est un marqueur d'activation comme rapporté dans d'autres articles (Agata et al., 1996; Yamazaki et al., 2002). En effet, il a été démontré que l'expression de PD-1 augmente de manière transitoire durant une infection virale aiguë. Cependant, durant une infection chronique par le LCMV ou le VIH, il a été démontré que des niveaux élevés de PD-1 se maintiennent dans le temps et contribuent à l'épuisement des lymphocytes T (Barber et al., 2006; Blackburn et al., 2010). Notre modèle de co-culture ne nous permet pas pour autant de comparer inflammation aiguë et chronique. Néanmoins, la surnutrition de souris pendant 16 semaines par un régime hypercalorique correspond à une inflammation chronique caractéristique de l'obésité. Au sein du tissu adipeux viscéral de ces souris nous avons en mis en évidence une augmentation d'expression de PD-1 et de PD-L1 par rapport aux souris nourries au régime standard, ce qui suggère donc que comme pour les infections chroniques ou les tumeurs le tissu adipeux blanc du sujet en état d'obésité contient des lymphocytes T probablement anergiques. On pourrait ainsi supposer que la lyse des adipocytes hypertrophiques par les lymphocytes cytotoxiques a lieu dans le stade précoce de l'obésité, mais est stoppée au cours du temps par les adipocytes et les CSA.


Cela pourrait permettre d'expliquer la sévérité des infections virales infiltrant le tissu adipeux comme dans le cas de la COVID-19. En effet, le virus SARS-CoV-2 est capable

d'infiltrer les adipocytes du fait de l'expression d'ACE2 par le tissu adipeux. De plus, l'expression d'ACE2 est augmentée chez les patients obèses et/ou diabétiques (Kruglikov and Scherer, 2020). Par conséquent, l'épuisement des lymphocytes et la diminution de leur fonction cytotoxique pourrait permettre au virus SARS-CoV-2 de résider dans le tissu adipeux, faisant alors de ce dernier un réservoir pour ce virus. Dans ce cas l'utilisation d'un anticorps bloquant PD-1 ou PD-L1 pourrait permettre de restaurer la réponse lymphocytaire chez les personnes obèses et la lyse des adipocytes infectés, comme montré dans la figure suivante.



Article

# Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediate PD-L1 Overexpression in the White Adipose Tissue of Obese Individuals, Resulting in T Cell Dysfunction

Assia Eljaafari <sup>1,2,3,\*</sup>, Julien Pestel <sup>1,2</sup> , Brigitte Le Magueresse-Battistoni <sup>1,2</sup> , Stephanie Chanon <sup>1,2</sup> , Julia Watson <sup>1,2</sup>, Maud Robert <sup>1,2,4</sup>, Emmanuel Disse <sup>1,2,5</sup> and Hubert Vidal <sup>1,2</sup>

- <sup>1</sup> Inserm U1060, University Claude Bernard Lyon 1, INRAE U1397, 69310 Pierre Bénite, France; julien.pestel@univ-lyon1.fr (J.P.); brigitte.lemagueresse@inserm.fr (B.L.M.-B.); Stephanie.chanon@univ-lyon1.fr (S.C.); Julia.watson@etu.univ-lyon1.fr (J.W.); maud.robert@chu-lyon.fr (M.R.); emmanuel.disse@chu-lyon.fr (E.D.); hubert.vidal@univ-lyon1.fr (H.V.)
- <sup>2</sup> CarMeN Laboratory, Centre Hospitalier Lyon Sud, 69310 Pierre Bénite, France
- <sup>3</sup> Direction des Affaires Médicales, Hospices Civils de Lyon (HCL), 69002 Lyon, France
- <sup>4</sup> Bariatric Surgery Department, Edouard Herriot Hospital, 69003 Lyon, France
- <sup>5</sup> Endocrinology Department, Lyon Sud, 69310 Pierre Bénite, France
- \* Correspondence: assia.eljaafari@univ-lyon1.fr



**Citation:** Eljaafari, A.; Pestel, J.; Le Magueresse-Battistoni, B.; Chanon, S.; Watson, J.; Robert, M.; Disse, E.; Vidal, H. Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediate PD-L1 Overexpression in the White Adipose Tissue of Obese Individuals, Resulting in T Cell Dysfunction. *Cells* **2021**, *10*, 2645. <https://doi.org/10.3390/cells10102645>

Academic Editors: Alessandro Poggi and Isabella Quinti

Received: 27 July 2021  
Accepted: 26 September 2021  
Published: 3 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The PD-L1/PD-1 immune checkpoint axis is the strongest T cell exhaustion inducer. As immune dysfunction occurs during obesity, we analyzed the impact of obesity on PD-L1/PD-1 expression in white adipose tissue (WAT) in mice and in human white adipocytes. We found that PD-L1 was overexpressed in WAT of diet-induced obese mice and was associated with increased expression of PD-1 in visceral but not subcutaneous WAT. Human in vitro cocultures with adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells (ASC) and mononuclear cells demonstrated that the presence of ASC harvested from obese WAT (i) enhanced PD-L1 expression as compared with ASC from lean WAT, (ii) decreased Th1 cell cytokine secretion, and (iii) resulted in decreased cytolytic activity towards adipocytes. Moreover, (iv) the implication of PD-L1 in obese ASC-mediated T cell dysfunction was demonstrated through PD-L1 blockade. Finally, (v) conditioned media gathered from these cocultures enhanced PD-L1 expression in freshly differentiated adipocytes, depending on IFN $\gamma$ . Altogether, our results suggest that PD-L1 is overexpressed in the WAT of obese individuals during IFN $\gamma$  secretion, leading to T cell dysfunction and notably reduced cytolytic activity. Such a mechanism could shed light on why adipose-tissue-infiltrating viruses, such as SARS-CoV-2, can worsen disease in obese individuals.

**Keywords:** PD-1/PD-L1 immune checkpoints; T cell dysfunction; adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells; white adipose tissue; inflammation; obesity; IFN $\gamma$

## 1. Introduction

Effective responses to intracellular pathogens or tumors are usually dependent on Natural killer (NK) cells and/or T cells, especially CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. NK cell killing can be regulated by killer cell inhibitory receptors (KIR) after being bound to HLA class I molecules [1]. Exhaustion is another way of inhibiting cytotoxic functions in either NK or CD8<sup>+</sup> cytolytic T cells (CTL), due to increased protein expression of inhibitory receptors such as PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, or TIGIT on T cells, or NKG2A on NK cells, and their respective ligands PD-L1 or PD-L2, CD 155, CD112, CD113, and HLAG/E on antigen-presenting cells [2]. These molecules are called immune checkpoints and the PD-1/PD-L1 axis is known as the strongest exhaustion inducer [3]. Moreover, tumors have been shown to use this pathway in order to escape antitumor immunity with the help of pro-inflammatory cytokines, particularly IFN $\gamma$  [4]. The expression of PD-L1 in tumors is now considered a good prognostic factor, due to the great improvement in

patient outcome with immune checkpoint inhibitors [5]. A Nobel Prize of Medicine was awarded in 2018 to James Allison and Tasuku Honjo for discovering immune checkpoints, which have been shown to have strong beneficial effects in cancer therapy after PD-L1 or PD-1 blockade. Several studies have demonstrated a negative correlation between CD4+ or CD8+ T cell frequencies and the severity of SARS-CoV-2 infection [6,7]. Indeed, total CD3+, CD8+, or CD4+ T cell frequencies below 800, 300, or 400/ $\mu\text{L}$ , respectively, were negatively associated with survival of COVID-19 [6]. In addition to reduced NK or T cell frequencies, functional exhaustion of these cells was demonstrated to contribute to SARS-CoV-2-mediated defective immune cell responses [6,7]. Exhaustion was first described upon long-term infection with viruses [8], but the hallmark of SARS-CoV-2 is its ability to use this inhibitory pathway in very early stages of infection. Moreover, NKG2A and PD-1 have been shown to be upregulated by SARS-CoV-2 in NK and T cells, respectively, and to be downregulated upon recovery from COVID-19, demonstrating that SARS-CoV-2 is an inducer of exhaustion [7]. Recent reports have demonstrated the resistance of mesenchymal stem cell (MSC) or ASC to SARS-CoV-2 infection [9] and the beneficial effects of healthy MSC transplantation in severe COVID-19 patients [10,11]. However, as opposed to ASC, adipocytes express the ACE2 receptor at high density, and even more when they belong to obese individuals [12], suggesting a mechanism that could account for the higher susceptibility of obese individuals to SARS-CoV-2 infection.

Obesity with a BMI of  $>30 \text{ Kg/m}^2$  is an independent risk factor for severe forms of COVID-19, as demonstrated in several clinical departments including ours, where 25% of hospitalized patients and 35% of ICU patients below the age of 70 were found to be obese [13,14]. Indeed, obesity is associated with comorbidities such as hypertension, hypercholesterolemia, cardiovascular diseases, atherosclerosis, type 2 diabetes, chronic inflammatory diseases, and various cancers [15]. Besides the elevation of chronic inflammation markers inside adipose tissues, plasma, and/or metabolically altered organs, immune dysfunction has also been described during obesity [16]. Indeed, higher rates of infection, delayed wound healing, and vaccination failure are often described in obese individuals. The impact of obesity on immunity has been related to various mechanisms, such as metabolic alterations in T cells, acceleration of thymic aging, alteration of lymphoid organ architecture, reduction in the maintenance of memory T cells, impairment of cell-mediated immune responses, abnormal lymphoproliferative responses, and decreased cytotoxic activities related to reduced NK and CD8+ T cell frequencies, especially among elderly individuals [17,18]. Moreover, increased T cell exhaustion due to enhanced PD-1 expression has recently been reported to occur in blood T cells among obese individuals suffering from cancer [19]. As white adipose tissue (WAT) is known to initiate inflammation in obese individuals, we investigated whether increased adiposity and inflammation in obesity could result in exhaustion of WAT-infiltrating T cells. Here, we showed that obesity is associated with PD-L1 overexpression inside WAT and implicated adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells (ASC) and  $\text{IFN}\gamma$  secretion in this upregulation. We also demonstrated that overexpression of PD-L1 has spread to cells present in the ASC environment, particularly to adipocytes.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals, Diet, and Experimental Design

All procedures were performed with the approval of the Regional Committee of Ethics for Animal Experiments (CECCAP), registered under number C2EA15 by the French Ministry of Higher Education and Research, in accordance with European directive 2010/63. The experimental protocol received the number 2018061411298503. Four-week-old C57Bl/6J male mice (Envigo; Gannat, France) were randomly housed, two per cage, at  $21^\circ\text{C}$  with a normal light/dark cycle, free access to water, and a standard chow diet (Genestil, Royaucourt, France) for a one-week acclimatization. Next, mice were randomly assigned to four different groups ( $n = 5\text{--}6/\text{group}$ ). One group was fed a standard diet (ST0;10% fat and 35.6% maltodextrin) and another was fed a high-fat/high-sucrose diet

(HF0; 39.4% fat and 16.6% maltodextrin +16.6% sucrose, Envigo). Food was given three times a week. Body weight was recorded weekly.

### 2.2. Tissue Collection and Blood and Plasma Analyses

Before sampling, the mice were fasted for 6 h and then weighed. Blood was collected by retro-orbital sampling and mice were euthanized by cervical dislocation. Adipose tissues were quickly removed, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Blood glucose concentrations (Accucheck Performa glucometer; Roche Diabetes Care, Meylan, France), plasma levels of insulin (Mouse Ultrasensitive ELISA, Eurobio, Courtaboeuf, 92973, France), leptin, and adiponectin (ELISA kits, CrystalChem Europe, Zaandam, Netherlands) were measured.

### 2.3. Isolation and Expansion of Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells

Subcutaneous or visceral AT samples were isolated from residues of bariatric surgery from obese subjects ( $\text{BMI} > 30\text{ kg/m}^2$ ), or visceral surgery from lean controls with the approval of the Committee for the Protection of Human Subjects of the “Hospices Civils de Lyon” number 12/111 and with the patient’s consent, according to ethical principles for medical research involving human subjects, as described in the World Medical Association’s Helsinki Declaration. AT samples (50–100 mg) were mechanically dissected and incubated in 2 g/L of collagenase type Ia solution (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in DMEM:F12 medium (50/50 vol/vol) (Invitrogen, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 40 min at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  by mixing. Isolation of ASC was performed as previously reported [20]. Adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells (ASC) were expanded in a culture medium composed of DMEM:F-12 supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L L-glutamine, and 100 U/mL penicillin–streptomycin. Culture medium was changed by half, three times a week, during 3–4 passages before being used or stored in liquid nitrogen. The function of ASC was validated as recommended by the French Cell Therapy Society [21] and checked for expression of CD90, CD105, and CD73 molecules.

### 2.4. Isolation of Blood Mononuclear Cells (MNC)

Blood samples from the Blood Bank Center of Lyon, Lyon, 69007, France) were obtained from healthy human blood donors. MNC were separated from blood through Ficoll-Histopaque density gradient centrifugation (Sigma-Aldrich) and stored in liquid nitrogen.

### 2.5. Coculture Assays

ASC were harvested and seeded in 24-well plates (100,000 cells/well) for 24 h in RPMI supplemented with 10% FCS. Then, 24 h later, MNC were added in the presence or absence of phytohemagglutinin (PHA,  $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ , Sigma-Aldrich). ASC/MNC ratios of 1:5 were used. For mRNA analyses, the culture period was 24 h, whereas it was 48 h when conditioning media were collected. In that latter case, IL-17A neutralizing antibodies (Secukinumab, Novartis Pharma S.A.S., 92506, Rueil-Malmaison, France) at  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  or IFN $\gamma$ -neutralizing antibodies (Invitrogen, 16-7318-81) at  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  were eventually added from the beginning of cultures. For blocking experiments, ASC/MNC cocultures were treated with PD-L1 neutralizing antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; AF156) at 1 or  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ , or with irrelevant polyclonal goat IgG (sc-8828; Santa-Cruz Biotechnology/INC, Heidelberg, Germany) at  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ , or Secukinumab at  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ .

### 2.6. mRNA Measurements

Total RNA was extracted from cocultures using the Tri Isolation Reagent<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics, Meylan, France) and frozen at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and RT-qPCR was performed from reversely transcribed RNA into cDNA, as previously described [20]. mRNA was quantified relative to the housekeeping gene TBP (TATA BOX binding protein), using the mathematical method depending on  $\Delta\text{CT}$  and the amplification efficiency of the transcripts, as described

by Plaffl et al. [22]. The individual primer sequences used for RT-qPCR are provided in Supplementary Table S1.

### 2.7. Flow Cytometry

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-, phycoerythrin (PE)- Allophycocyanin (APC)-, and Alexa-fluor- directly conjugated anti-human antibodies were used to stain the various cells tested: CD14 (21270146; ImmunoTools, Friesoythe, Germany), CD73 (21270734; ImmunoTools), CD8 (21270083; ImmunoTools), CD274 (12-5982-82; Invitrogen, Illkirch, France), CD279 (FAB7115G; R&D Systems, Biotechnie, Abingdon, UK), and Granzyme B (IC2906G; R&D Systems). Analyses were performed using a LSR II 3 lasers cytofluorometer and Diva software (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France). For Granzyme B intracellular staining, cells were permeabilized using the BD Cytotfix/Cytoperm permeabilizing kit (AB\_2869008; Beckton Dickinson, Le-Pont-de-Claix, France), and cells were analyzed 6 h after interaction with adipocytes.

### 2.8. Differentiation of Obese Subcutaneous ASC into AD

Ob-ASC were differentiated into AD as previously described [20].

### 2.9. Immunohistochemistry

ATs were fixed in formaldehyde 3.7% after isolation from bariatric surgery. They were then embedded in paraffin before being cut with the microtome MICROT002 and mounted onto microscope slides for analysis, after staining with anti-human PD-L1 (R&D Systems; MAB1561) at 1:50 dilution.

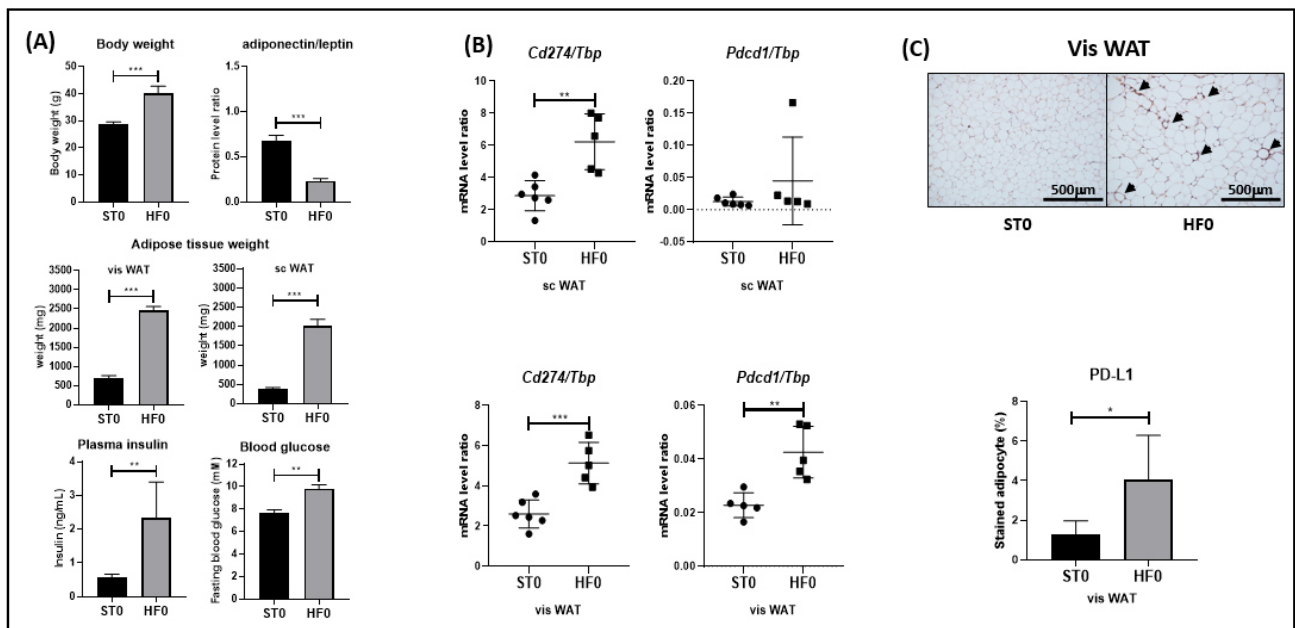
### 2.10. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA with or without repeated measures, or mixed-effects analyses (if some values were missing), followed by post hoc Fisher's LSD tests. In some experiments, two-tailed unpaired t-tests were used. Prism software was employed for analysis (Prism 8, GraphPad software, San Diego, CA, USA). Differences were considered as statistically significant when  $p$  was  $<0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. PD-L1 and/or PD-1 Are Overexpressed in the WAT of Obese Mice

Whereas blood T cells from obese individuals or mice have been shown to overexpress the PD-1 checkpoint [19], here we investigated the possibility that WAT-infiltrating T cells could also express markers of exhaustion among the obese. With this goal in mind, we used a high-fat-diet-induced obesity (DIO) mouse model, wherein postweaning C57BL/6 male mice were fed either a control (chow) or hypercaloric diet for 16 weeks, and we measured the mRNA expression levels of PD-L1/PD-1 exhaustion markers. As shown in Figure 1A, the efficiency of the hypercaloric diet was assessed through (i) increased body weight and white adipose tissue mass; (ii) metabolic consequences, such as increased fasting plasma insulin and blood glucose; and (iii) adipokine disturbances, such as decreased adiponectin over leptin protein levels (Figure 1A). In addition, PD-L1 was overexpressed at the mRNA level in both the visceral (vis) and subcutaneous (sc) WAT of obese, in comparison with lean mice (Figure 1B). However, increased PD-1 expression was observed in the vis but not sc WAT of mice fed with the hypercaloric diet (Figure 1B), which suggested more pronounced inhibition of T cell functions in vis. To support these results, immunohistochemistry was used to stain obese or lean visceral WAT for PD-L1. As shown in Figure 1C, a significant increase in PD-L1 expression was observed in the vis WAT of obese mice.

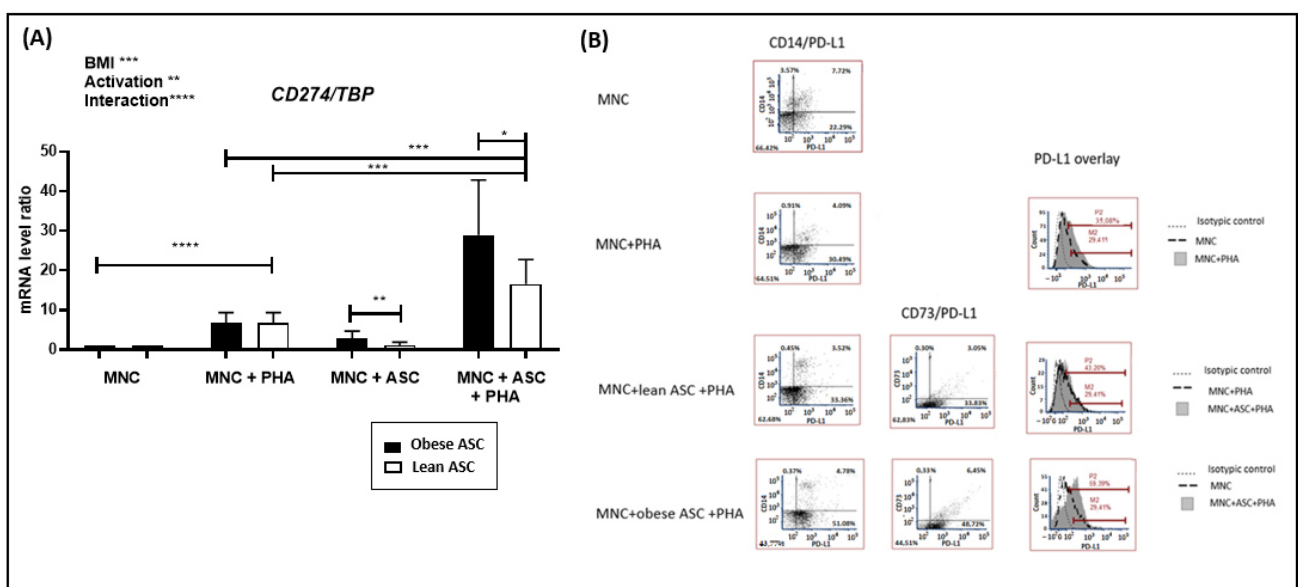


**Figure 1.** PD-L1 and/or PD-1 are overexpressed in the WAT of obese mice. C57BL/6 mice were fed with a normal or hypercaloric diet for 16 weeks (STO versus HFO). (A) Body and adipose tissue weight were measured, together with plasma insulin and blood glucose, after sacrifice. (A,B) serum adiponectin and leptin were measured by ELISA. *Cd274(Pdl1)* and *Pdccl1(Pdl1)* mRNA were extracted from subcutaneous (sc) or visceral AT and their levels measured by RT-PCR. (C) Immunohistochemistry staining of PD-L1 in vis WAT. Results are expressed as a ratio relative to the *Tbp* housekeeping gene. (A,C) Black or grey histograms correspond to STO, or HFO mice, respectively. (B) Black circles, or black squares correspond to STO, or HFO mice, respectively. (C) Black triangles correspond to positively stained PD-L1 molecules. Two-tailed unpaired *t*-tests were used to prove the statistical significance of the results when *p* was <0.05. \*\*\*, \*\*, \* represents a *p*-value of <0.001, <0.01, <0.05 respectively. Data are the mean  $\pm$  SD of *n* = 6, or 5 for STO or HFO, respectively.

### 3.2. Inflammation-Mediated by Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells from Obese Individuals Contributes to PD-L1 Upregulation in Cocultures with Mononuclear Cells

Having previously demonstrated that adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells (ASC) from obese individuals (ob-ASC), rather than from lean individuals, can promote inflammation through Th17 cell and monocyte cell activation [23], we then investigated whether inflammation-mediated by ob-ASC could play a role in upregulating PD-L1 and/or PD-1 expression using a human in vitro coculture model. As shown in Figure 2A, phytohemagglutinin A (PHA) activation of mononuclear cells (MNC) enhanced *PDL1* mRNA expression levels, but the co-presence of ASC resulted in potentiating the expression of *PDL1* mRNA, whether ASC were issued from lean or obese donors. However, ob-ASC upregulated *PDL1* mRNA expression at a statistically significant higher level than lean ASC. In addition, a two-way ANOVA test demonstrated (i) that both the body mass index (BMI) and the activation status were statistically significant independent factors, (ii) as well as the interaction between these two factors (Figure 2A). Then, to validate those results at the protein level and investigate whether increased PD-L1 levels occurred in MNC or ASC themselves, we co-stained monocytes or ASC with the CD14 or CD73 marker, respectively, and the PD-L1 molecules. As shown in Figure 2B, flow cytometry supported the mRNA data. Indeed, an increased surface expression of PD-L1 occurred, following PHA activation of MNC (i.e., 29.4–35.1% of positive PD-L1 cells), which was potentiated by the presence of ob-ASC (29.4–59.4%), but with a weaker potentiating effect in the presence of lean ASC (29.4–43.2%). CD14 labelling showed that PD-L1 was expressed at the basal level in monocytes with approximately 2/3 of the CD14 positive cells expressing both CD14 and PD-L1 (i.e., 7.7% of cells were doubly positive for CD14 and PD-L1, versus 3.6% singly positive for CD14). However, following 48 h of activation with PHA, almost the whole

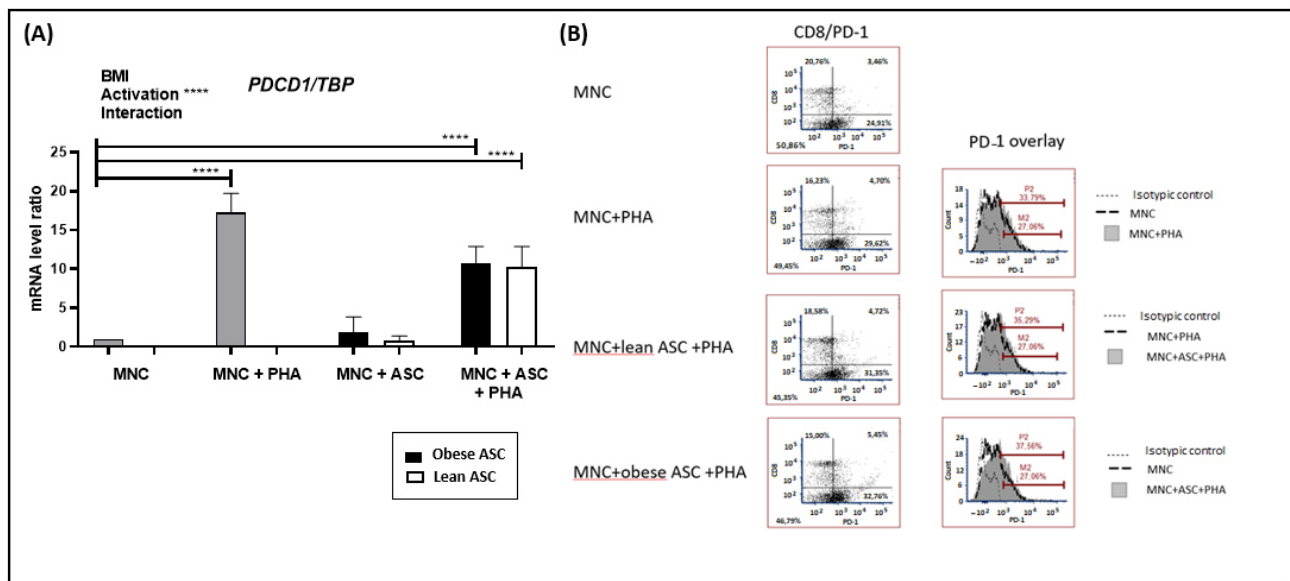
population of CD14-positive cells became doubly positive for PD-L1, even though their ratio diminished from 7.7% to 4.05% of total cells, probably due to the proliferation of PHA-activated T cells. The presence of obese or lean ASC did not induce any upregulation of the surface expression level of PD-L1 in monocytes. However, it resulted in the upregulation of the intensity of CD14 fluorescence, suggesting the transition of monocytes towards a population of “classical monocytes”, as previously described [24]. Moreover, PD-L1 expression in CD73+ ob-ASC was higher than in lean ASC (i.e., from 3.0% to 6.4%). However, the prominent population of cells in which PD-L1 expression was upregulated was CD73-negative (i.e., from 33.8% to 48.7%). This latter population was likely to correspond to activated T lymphocytes, as T cells were the most preponderant cells in those cocultures, on the one hand, and are known to express PD-L1 expression following antigenic stimulation, on the other hand [25,26]. Altogether, those results demonstrated that PD-L1 expression is upregulated following activation with PHA at both the transcriptional and protein levels, and was considerably amplified by the presence of ob-ASC.



**Figure 2.** Inflammation, mediated by adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells (ASC) from obese individuals, contributes to PD-L1 upregulation in cocultures with mononuclear immune cells. MNC were activated by PHA in the presence or absence of ob-ASC or lean ASC. (A) *CD274* (*PDL1*) mRNA expression levels were measured by RT-qPCR. Results are expressed as a ratio relative to the *TBP* housekeeping gene. Two-way ANOVA with Fisher’s LSD comparison tests were used. Data are the mean  $\pm$  SD of  $n = 4$ . \*\*\*\*, \*\*\*, \*\*, and \* represent a  $p$ -value  $<0.0001$ ,  $<0.001$ ,  $<0.01$ , or  $<0.05$ , respectively. (B) Membrane expression of PD-L1 was measured by flow cytometry in cells stained for CD14 or CD73. Results are representative of two experiments with two different ASC.

### 3.3. Activation of T Cells Upregulates PD-1 Expression but Is Not Influenced by the Presence of Adipose-Derived Stem Cells (ASC)

Because PD-1 needs to be linked by PD-L1 to exert its inhibitory effect on T cells, we then investigated whether the presence of obese ASC could also upregulate its expression. As shown in Figure 3A, PHA activation of MNC increased the levels of PD1 mRNA expression, but the presence of obese or lean ASC did not further influence its expression. Supporting these results, and as shown in Figure 3B, PD-1 surface expression was enhanced in PHA-activated MNC (i.e., from 27% to 33.79%). Those levels barely increased from 33.79% to 35.29% or 37.56% in the presence of lean or ob-ASC, respectively. The levels of CD8+ doubly positive cells for PD-1 increased, i.e., from 3.5% in the resting state to 4.7% with PHA, and were barely increased in the presence of ob-ASC from 4.7% to 5.45%. Therefore, these results suggested that PD-1 is likely to be a marker of activation, with obese ASC influencing PD-L1, but not—or only slightly—PD-1 expression.



**Figure 3.** Activation of T cells upregulates PD-1 expression but is not influenced by ASC. MNC were activated by PHA in the presence or absence of ob-ASC or lean ASC. (A) *PDCD1* (*PD1*) mRNA expression levels were measured by RT-qPCR. Results were expressed as a ratio relative to the *TBP* housekeeping gene. Two-way ANOVA with Fisher's LSD comparison tests were used. Data are the mean  $\pm$  SD of  $n = 4$ . \*\*\*\* represents a  $p$ -value  $< 0.0001$ . (B) Membrane expression of PD-1 was measured by flow cytometry in cells also stained for CD8. Results are representative of two experiments with two different ASC.

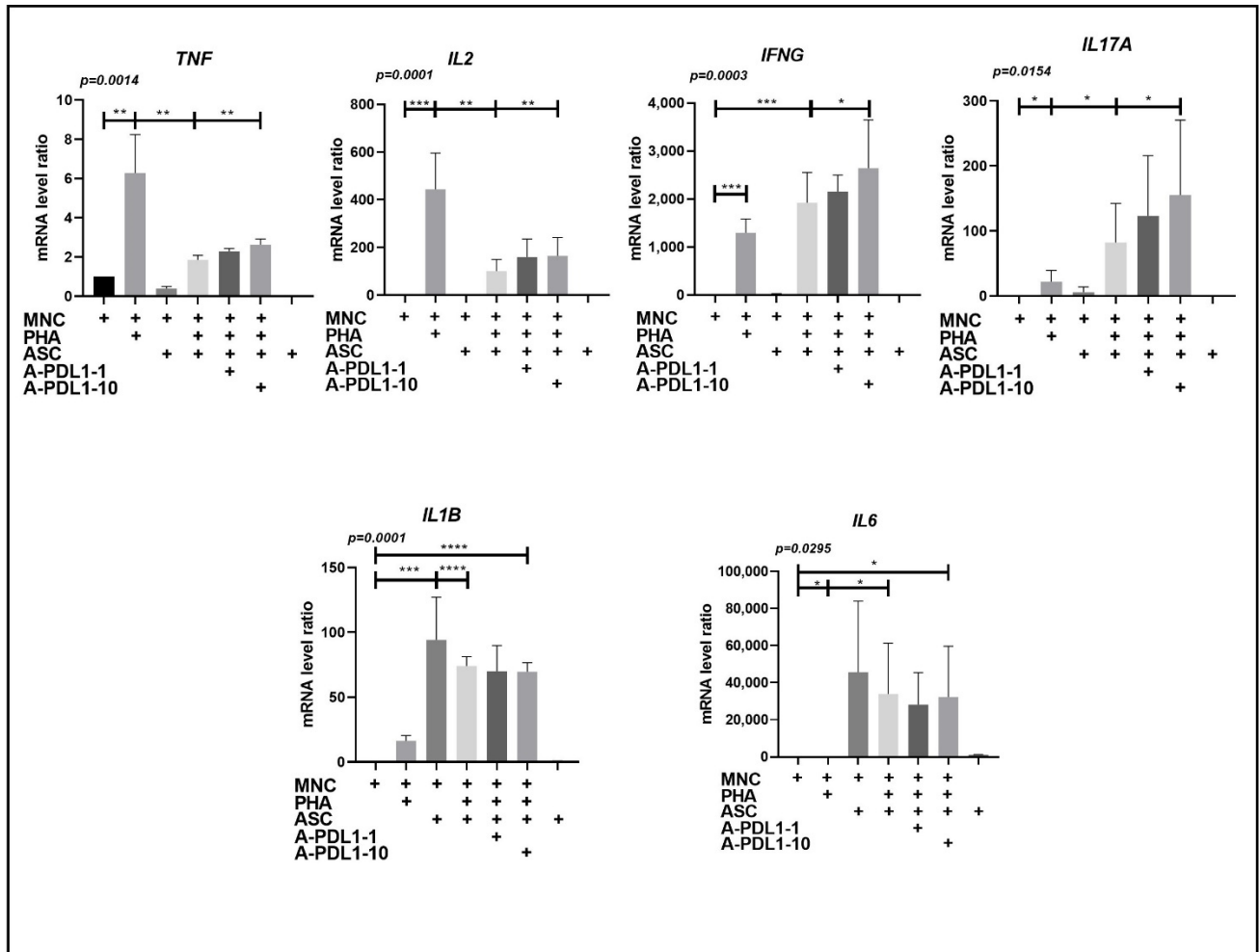
### 3.4. PD-L1 Blockade Partially Restores Th1 Cell Secretion and Improves Ob-ASC Mediated Th17 Cell Activation, without Affecting Pro-Inflammatory Cytokine Secretion by Accessory Cells

To then analyze the consequences of PD-L1 overexpression, we measured the effects of PD-L1 blockade on the pro-inflammatory cytokine expression. As previously reported [23] and as shown in Figure 4, the presence of ob-ASC resulted in increasing IL-17A, IL-1B, and IL-6, together with decreasing TNF $\alpha$  and IL-2 mRNA expression levels, as compared with PHA-activated MNC. The modification of the cytokine pattern has been previously reported by us to be related to (i) the immunomodulatory effect of ASC on Th1 responses, (ii) the promotion by ob-ASC of Th17 double positive cells, secreting both IL-17 and IFN $\gamma$ , and (iii) the activation of pro-inflammatory secretion by accessory cells such as monocytes and ob-ASC [23]. The addition of neutralizing anti-PD-L1 mAbs in those cocultures resulted in the partial restoration of Th1 cell responses, as assessed by increased TNF $\alpha$  and IL-2 mRNA expression levels. An increase in IL-17A and IFN $\gamma$  mRNA expression by Th17 cells was also observed. However, *IL1B* and *IL6* mRNA expression levels were not modified, thus demonstrating a specific PD-L1 inhibitory effect on T cell functions. The specificity of the anti-PD-L1 effects was supported by further experiments comparing IL-17 and PD-L1 blockade (Figure S1).

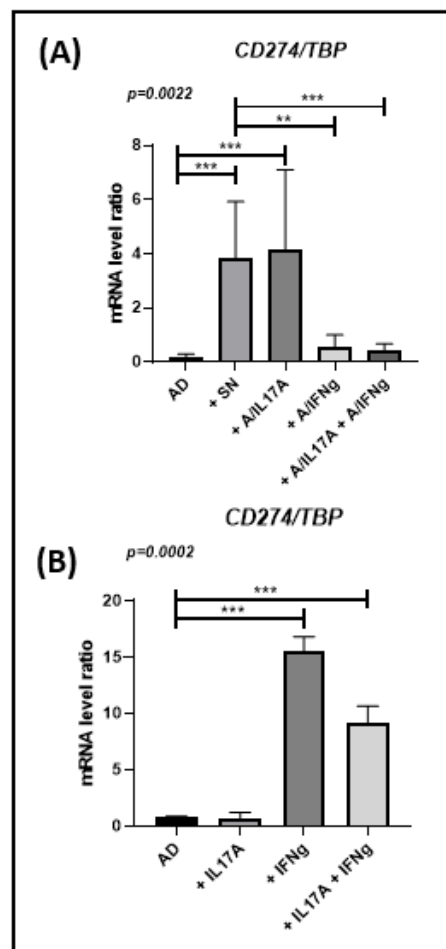
### 3.5. Ob-ASC-Mediated Inflammation Results in Increasing PD-L1 Expression in Freshly Differentiated Adipocytes

Because the micro-environment plays an important role in the propagation of inflammation in WAT, we then asked whether conditioned media (CM) collected from ob-ASC and MNC cocultures could propagate exhaustion. Therefore, we cultured freshly differentiated adipocytes from ob-ASC with CM harvested from PHA-activated cocultures. We observed a strong upregulation of the expression of *PDL1* mRNA, up to almost 4-fold. Having previously demonstrated that Th17 cells play an important role in the propagation of inflammation in this coculture model [20], we then asked whether cytokines secreted by those T cells, i.e., IL-17A and/or IFN $\gamma$ , could play a role in *PDL1* mRNA overexpression in adipocytes. Therefore, neutralizing antibodies directed against IFN $\gamma$  or IL-17A were

added or not to these cocultures. The results clearly showed that CM-mediated *PDL1* mRNA overexpression was dependent on  $IFN\gamma$  secretion only, since blockade of  $IFN\gamma$  but not IL-17A prevented CM effects on *PDL1* mRNA overexpression (Figure 5A). To validate these results, we reciprocally added  $IFN\gamma$ , or IL-17A recombinant protein to adipocytes and observed that  $IFN\gamma$ , but not IL-17A, significantly upregulated *PDL1* mRNA expression (Figure 5B).



**Figure 4.** PD-L1 blockade partially restores Th1 cell secretion and improves ob-ASC mediated Th17 cell activation without any effect on pro-inflammatory cytokine secretion by accessory cells. MNC were activated by PHA in the presence or absence of ob-ASC and anti-PD-L1mAbs at concentrations of 1 or 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cytokine mRNA expression levels were measured by RT-qPCR. Results were expressed as a ratio relative to the *TBP* housekeeping gene. The one-way ANOVA with Fisher’s LSD comparison tests were used. Data are the mean  $\pm$  SD of  $n = 4$ . The  $p$ -value shown in the figure is from an ANOVA test, whereas \*\*\*\*, \*\*\*, \*\*, or \* represents  $p$ -values of <0.0001, <0.001, <0.01, <0.05 respectively, from Fisher’s LSD tests.



**Figure 5.** Ob-ASC mediated inflammation results in increasing *PDL1* mRNA expression in freshly differentiated adipocytes. Adipocytes were differentiated from ob-ASC in the presence or absence of conditioned media (CM) collected from activated ob-ASC/MNC cocultures, with or without anti-IL-17A, anti-IFN $\gamma$ , or both mAbs (A), or the presence of IFN $\gamma$ , IL-17A, or both cytokines (B). *CD274* (*PDL1*) mRNA expression levels were measured by RT-qPCR. Results were expressed as a ratio relative to the *TBP* housekeeping gene. One-way ANOVA with Fisher's LSD comparison tests were used. ( $n = 4$  in (A), or 2 in (B)). The  $p$ -value shown in the figure are those of ANOVA tests, whereas \*\*\*, \*\* represent  $p$ -values  $<0.001$  or  $<0.01$ , respectively, of Fisher's LSD tests.

#### 4. Discussion

Brown adipocytes and differentiated 3T3 cell lines have been shown to express PD-L1 [27,28]. Additionally, we demonstrated that white adipocyte precursors can also overexpress PD-L1 following interaction with MNC, especially when they were collected from obese individuals (Figure 2). Interestingly, we demonstrated that inflammation mediated by ob-ASC and MNC cocultures spread PD-L1 overexpression to cells present in their environment, especially adipocytes, under the influence of IFN $\gamma$  secretion (Figure 5). A role for IFN $\gamma$  in the induction of exhaustion has already been reported by others, particularly in a tumoral model [4,29], thus demonstrating a regulatory role for IFN $\gamma$ , in addition to its role in activating effectors such as macrophages or other accessory cells. Moreover, our data suggested that the negative modulation of Th1 cells that occurred in the presence of ob-ASC was partly related to IFN $\gamma$ -mediated PD-L1 overexpression, as the PD-L1 blockade partially restored Th1 cell cytokine secretion (Figure 4).

IL-2 is a cytokine that plays a major role in the maturation of precytotoxic T cells into cytotoxic T cells (CTL) in order to allow them to subsequently exert their cytotoxic function [30]. We have previously reported that the presence of mesenchymal stem cells

inhibit pre-CTL differentiation into CTL effectors, which is restored by the addition of IL-2 [31]. Therefore, our results suggest that ob-ASC may inhibit the maturation of pre-CTL into CTL effectors and subsequent CTL function through IL-2 negative modulation. Moreover, PD-L1 overexpression may partly account for this inhibition, as demonstrated by the positive effects of the PD-L1 blockade on *IL2* mRNA expression (Figure 4). Of interest, CTL activity was reduced in the presence of obese adipocytes in comparison with lean adipocytes, as demonstrated by granzyme B intracellular staining (Figure S2), thus suggesting that ASC-mediated spreading of PD-L1 overexpression towards obese adipocytes may inhibit obese adipocytes' ability to activate CTL effectors.

PD-1 was also found to be upregulated following activation of MNC with PHA (Figure 3). However, this upregulation was not potentiated by the presence of ASC, suggesting that PD-1 is a marker of activation, in agreement with several studies reporting a regulatory function of PD-1 or other immune checkpoints, notably CTLA-4 [32–35]. Indeed, PD-1 was demonstrated to be transiently expressed during acute viral infections in order to regulate T cell functions. However, in chronic infection with LCMV or HIV, high levels of PD-1 were shown to be sustained over time and to contribute to T cell exhaustion [36,37]. In our coculture model, we were not able to compare acute and chronic stimulation. However, when mice were fed a hypercaloric regimen for 16 weeks, which corresponded to a chronic situation, we observed an upregulation of PD-1 along with PD-L1 in the vis WAT of obese mice in comparison to the vis WAT of lean mice (Figure 1). However, in the sc WAT of obese mice, PD-L1 but not PD-1 was upregulated, probably due to the higher levels of pro-inflammatory cytokine secretion known to be present in vis WAT [38].

Altogether, these data lead us to suggest that increased expression of PD-L1 on adipocytes and of PD-1 on T cells may trigger exhaustion and inhibit T cell functions, in particular IL-2 secretion and subsequent CTL function. This could be of high importance in situations where viruses infiltrate WAT. Infection with SARS-CoV-2 could represent one such situation, as AT is known to express ACE2, a receptor for the spike protein of SARS-CoV-2 [12]. Interestingly enough, the expression of ACE2 has been shown to be upregulated in the epicardial fat of obese versus lean mice [39]. Therefore, increased exhaustion of T cells in the inflammatory environment present in obese visceral WAT could help SARS-CoV-2 to reside inside it, which may lead us to consider fat as a reservoir for this virus. It would then become easy for the virus to invade and spread in proximal tissues or organs, as suggested by Nishimura et al. for the H5N1 virus [40]. In that case, anti-PD-1 or anti-PD-L1 biologics could become a promising alternative approach to help obese individuals achieve a better immune response against the severe form of COVID-19, as shown in the graphical abstract. Accordingly, when PD-L1 was neutralized with specific antibodies, we observed a partial restoration of cytokines expressed by Th1 cells, notably IL-2, which plays a critical role in precytolytic (CTL) differentiation into CTL effectors (Figure 4).  $\text{TNF}\alpha$ , IL-17A, and  $\text{IFN}\gamma$  also increased, demonstrating the inhibitory effect of PD-L1 on T cell function whatever the T cell subset. Moreover, IL-1 $\beta$  and IL-6 pro-inflammatory cytokines, which were shown to be secreted by monocytes and ob-ASC in our model [17], did not increase after PD-L1 blockade, thus demonstrating the specificity of the PD-L1 blockade.

## 5. Limitations of the Study

This study was performed first in vivo in animals and then in in vitro coculture assays with human ASC and MNC. These assays have been used to investigate the mechanisms leading to increased expression of immune checkpoints, as observed in vivo. Although these coculture assays have been previously used to demonstrate the role of ASC, Th17 cells, and monocytes in initiating inflammation among AT from obese individuals [23], they have some limitations relative to the cell isolation and 2D culture processes and thus do not exactly correspond to the in vivo situation. Then, we demonstrated that inflammation may lead to exhaustion of T cells following interaction of MNC with ASC relative to increased expression of immune checkpoints, and suggested, in Section 4, that T cell exhaustion in

WAT could contribute to the higher susceptibility of obese individuals to viruses infecting WAT, as seen during the COVID-19 pandemic. However, we did not directly test this hypothesis in the present study, such as by investigating the cytolytic activity against adipocytes previously infected by viruses, and notably SARS-CoV-2, in the presence or absence of anti-PD-L1. Indeed, such investigation would require additional experiments with specific SARS-CoV-2-infected adipose tissue, which is not available in our laboratory due to regulatory aspects.

## 6. Conclusions

In this study, we analyzed the impact of obesity on immune checkpoint expression in WAT, using a mouse model of diet-induced obesity. We observed that PD-L1 is overexpressed in WAT of obese mice, and is associated with increased expression of PD-1 in visceral WAT as compared with lean mice. Using human in vitro cocultures with ASC from obese individuals and MNC, we also observed an overexpression of PD-L1 with respect to cocultures with ASC from nonobese individuals. Moreover, conditioned media harvested from these cocultures enhanced PD-L1 expression in freshly differentiated adipocytes, depending on the presence of IFN $\gamma$ . As adipocytes differentiated from obese ASC impaired cytotoxic activity, our results suggest that PD-L1 overexpression may occur in the visceral WAT of obese individuals under IFN $\gamma$  secretion and may lead to T cell dysfunction, notably decreased cytolytic activity. Such a mechanism could shed some light on why adipose tissue-infiltrating viruses such as SARS-CoV-2 can worsen disease in obese individuals.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10102645/s1>, Figure S1: Specificity of PD-L1 blockade, as compared with IL-17A blockade, Figure S2: CTL activity is reduced in the presence of obese versus lean ASC, Table S1: List of primers used for RT-QPCR in the study.

**Author Contributions:** A.E. designed the study, interpreted the data, got the funding, and wrote the manuscript. J.P. carried out most of the experiments and helped with the analysis of data and the revision of the manuscript. B.L.M.-B. provided the mouse adipose tissues and corrected several drafts of the manuscript. S.C. performed the immunohistochemistry studies with the help of J.W.; J.W. also helped to correct English language errors. M.R. provided human adipose tissue and helped with the discussion and the manuscript. E.D. helped with the discussion and the manuscript. H.V. discussed the results and provided constructive comments on the final version of manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** IDEX Lyon financed part of our present study on immune checkpoint and obesity. IDEX/COV/2020-12.

**Institutional Review Board Statement:** Approval of the Regional Committee of Ethics for Animal Experiments was acquired. Approval of the Committee for the Protection of Human Subjects of the Hospices Civils de Lyon was acquired.

**Informed Consent Statement:** Informed content was acquired from patients prior to collecting residual adipose tissue during surgery.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available within the article.

**Acknowledgments:** In addition to University Claude Bernard Lyon 1, INSERM, and HCL, we wish to thank the EDISS doctoral school for having selected J.P. for a thesis fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no competing financial interest.

## References

1. Long, E.O.; Kim, H.S.; Liu, D.; Peterson, M.E.; Rajagopalan, S. Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annu. Rev. Immunol.* **2013**, *31*, 227–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kim, N.; Kim, H.S. Targeting Checkpoint Receptors and Molecules for Therapeutic Modulation of Natural Killer Cells. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2041. [[CrossRef](#)]

3. Sun, C.; Mezzadra, R.; Schumacher, T.N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* **2018**, *48*, 434–452. [[CrossRef](#)]
4. Garcia-Diaz, A.; Shin, D.S.; Moreno, B.H.; Saco, J.; Escuin-Ordinas, H.; Rodriguez, G.A.; Zaretsky, J.M.; Sun, L.; Hugo, W.; Wang, X.; et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 1189–1201. [[CrossRef](#)]
5. Baumeister, S.H.; Freeman, G.J.; Dranoff, G.; Sharpe, A.H. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **2016**, *34*, 539–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Diao, B.; Wang, C.; Tan, Y.; Chen, X.; Liu, Y.; Ning, L.; Chen, L.; Li, M.; Liu, Y.; Wang, G.; et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zheng, M.; Gao, Y.; Wang, G.; Song, G.; Liu, S.; Sun, D.; Xu, Y.; Tian, Z. Functional Exhaustion of Antiviral Lymphocytes in COVID-19 Patients. *Cell Mol. Immunol.* **2020**, *17*, 533–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Freeman, G.J.; Wherry, E.J.; Ahmed, R.; Sharpe, A.H. Reinvigorating Exhausted HIV-Specific T Cells via PD-1-PD-1 Ligand Blockade. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 2223–2227. [[CrossRef](#)]
9. Schäfer, R.; Spohn, G.; Bechtel, M.; Bojkova, D.; Baer, P.C.; Kuçi, S.; Seifried, E.; Ciesek, S.; Cinatl, J. Human Mesenchymal Stromal Cells Are Resistant to SARS-CoV-2 Infection under Steady-State, Inflammatory Conditions and in the Presence of SARS-CoV-2-Infected Cells. *Stem Cell Rep.* **2020**, *16*, 419–427. [[CrossRef](#)]
10. Liang, B.; Chen, J.; Li, T.; Wu, H.; Yang, W.; Li, Y.; Yu, C.; Nie, F.; Ma, Z.; et al. Clinical Remission of a Critically Ill COVID-19 Patient Treated by Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *Med.* **2020**, *99*, e21429. [[CrossRef](#)]
11. Leng, Z.; Zhu, R.; Hou, W.; Feng, Y.; Yang, Y.; Han, Q.; Shan, G.; Meng, F.; Du, D.; Wang, S.; et al. Transplantation of ACE2-Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging Dis.* **2020**, *11*, 216. [[CrossRef](#)]
12. Kruglikov, I.L.; Scherer, P.E. The Role of Adipocytes and Adipocyte-Like Cells in the Severity of COVID-19 Infections. *Obesity* **2020**, *28*, 1187–1190. [[CrossRef](#)]
13. Lighter, J.; Phillips, M.; Hochman, S.; Sterling, S.; Johnson, D.; Francois, F.; Stachel, A. Obesity in Patients Younger Than 60 Years Is a Risk Factor for COVID-19 Hospital Admission. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 896–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Caussy, C.; Pattou, F.; Wallet, F.; Simon, C.; Chalopin, S.; Telliam, C.; Mathieu, D.; Subtil, F.; Frobert, E.; Alligier, M.; et al. Prevalence of Obesity among Adult Inpatients with COVID-19 in France. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2020**, *8*, 562–564. [[CrossRef](#)]
15. Chehimi, M.; Vidal, H.; Eljaafari, A. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 68. [[CrossRef](#)]
16. Martí, A.; Marcos, A.; Martínez, J.A. Obesity and Immune Function Relationships. *Obes. Rev.* **2001**, *2*, 131–140. [[CrossRef](#)]
17. Chatzigeorgiou, A.; Karalis, K.P.; Bornstein, S.R.; Chavakis, T. Lymphocytes in Obesity-Related Adipose Tissue Inflammation. *Diabetologia* **2012**, *55*, 2583–2592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Andersen, C.J.; Murphy, K.E.; Fernandez, M.L. Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. *Adv. Nutr.* **2016**, *7*, 66–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Wang, Z.; Aguilar, E.G.; Luna, J.I.; Dunai, C.; Khuat, L.T.; Le, C.T.; Mirsoian, A.; Minnar, C.M.; Stoffel, K.M.; Sturgill, I.R.; et al. Paradoxical Effects of Obesity on T Cell Function during Tumor Progression and PD-1 Checkpoint Blockade. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 141–151. [[CrossRef](#)]
20. Pestel, J.; Chehimi, M.; Bonhomme, M.; Robert, M.; Vidal, H.; Eljaafari, A. IL-17A Contributes to Propagation of Inflammation but Does Not Impair Adipogenesis and/or Insulin Response, in Adipose Tissue of Obese Individuals. *Cytokine* **2020**, *126*, 154865. [[CrossRef](#)]
21. Bourin, P.; Bunnell, B.A.; Casteilla, L.; Dominici, M.; Katz, A.J.; March, K.L.; Redl, H.; Rubin, J.P.; Yoshimura, K.; Gimble, J.M. Stromal Cells from the Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction and Culture Expanded Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells: A Joint Statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* **2013**, *15*, 641–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Pfaffl, M.W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Eljaafari, A.; Robert, M.; Chehimi, M.; Chanon, S.; Durand, C.; Vial, G.; Bendridi, N.; Madec, A.-M.; Disse, E.; Laville, M.; et al. Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. *Diabetes* **2015**, *64*, 2477–2488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kapellos, T.S.; Bonaguro, L.; Gemünd, I.; Reusch, N.; Saglam, A.; Hinkley, E.R.; Schultze, J.L. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2035. [[CrossRef](#)]
25. Latchman, Y.E.; Liang, S.C.; Wu, Y.; Chernova, T.; Sobel, R.A.; Klemm, M.; Kuchroo, V.K.; Freeman, G.J.; Sharpe, A.H. PD-L1-Deficient Mice Show That PD-L1 on T Cells, Antigen-Presenting Cells, and Host Tissues Negatively Regulates T Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10691–10696. [[CrossRef](#)]
26. Dong, H.; Strome, S.E.; Matteson, E.L.; Moder, K.G.; Flies, D.B.; Zhu, G.; Tamura, H.; Driscoll, C.L.W.; Chen, L. Costimulating Aberrant T Cell Responses by B7-H1 Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Investig.* **2003**, *111*, 363–370. [[CrossRef](#)]
27. Ingram, J.R.; Dougan, M.; Rashidian, M.; Knoll, M.; Keliher, E.J.; Garrett, S.; Garforth, S.; Blomberg, O.S.; Espinosa, C.; Bhan, A.; et al. PD-L1 Is an Activation-Independent Marker of Brown Adipocytes. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 647. [[CrossRef](#)]

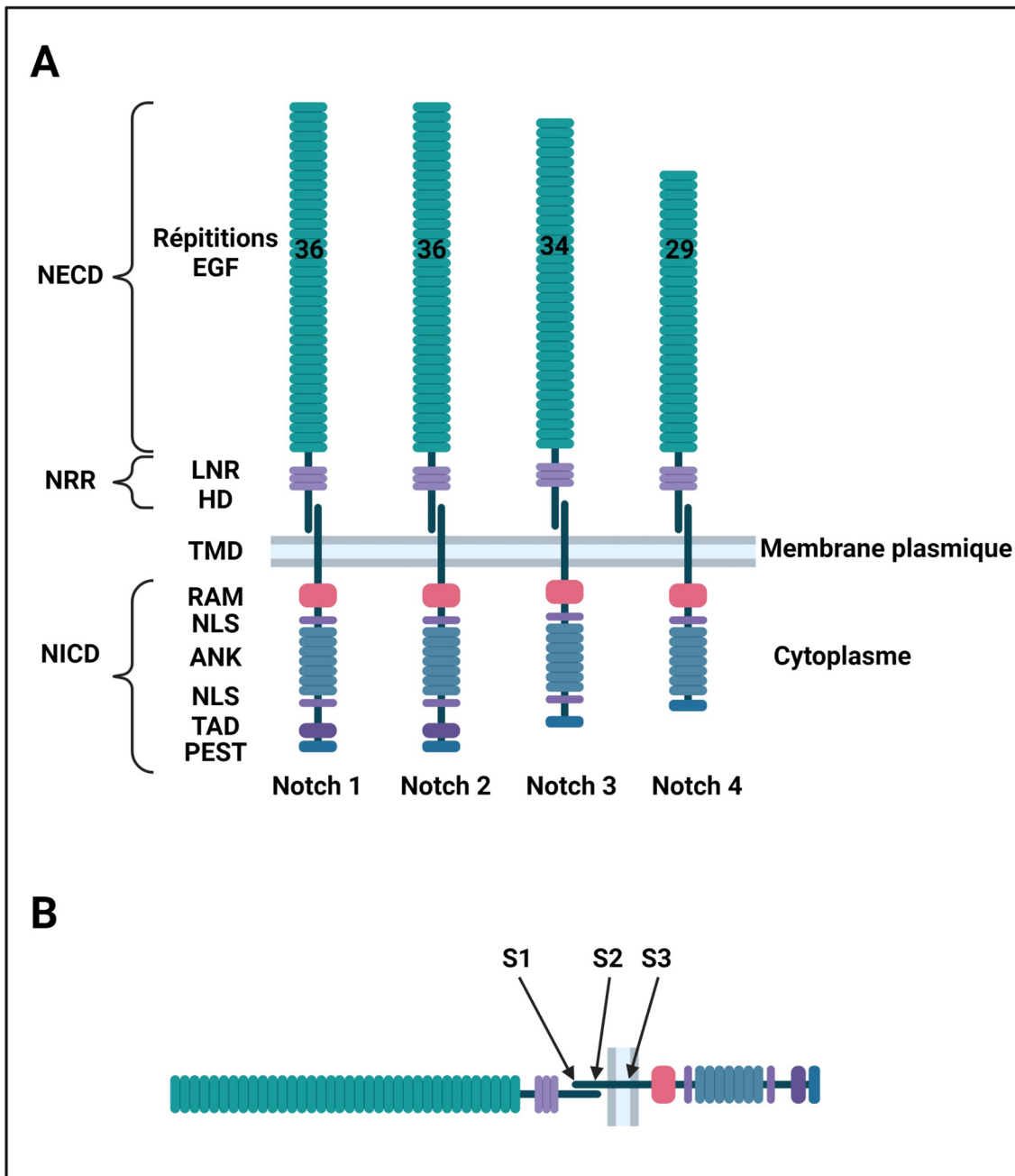
28. Li, Z.; Zhang, C.; Du, J.-X.; Zhao, J.; Shi, M.-T.; Jin, M.-W.; Liu, H. Adipocytes Promote Tumor Progression and Induce PD-L1 Expression via TNF- $\alpha$ /IL-6 Signaling. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 179. [[CrossRef](#)]
29. Benci, J.L.; Johnson, L.R.; Choa, R.; Xu, Y.; Qiu, J.; Zhou, Z.; Xu, B.; Ye, D.; Nathanson, K.L.; June, C.H.; et al. Opposing Functions of Interferon Coordinate Adaptive and Innate Immune Responses to Cancer Immune Checkpoint Blockade. *Cell* **2019**, *178*, 933–948.e14. [[CrossRef](#)]
30. Kern, D.E.; Gillis, S.; Okada, M.; Henney, C.S. The Role of Interleukin-2 (IL-2) in the Differentiation of Cytotoxic T Cells: The Effect of Monoclonal Anti-IL-2 Antibody and Absorption with IL-2 Dependent T Cell Lines. *J. Immunol.* **1981**, *127*, 1323–1328.
31. Angoulvant, D.; Clerc, A.; Benchalal, S.; Galambrun, C.; Farre, A.; Bertrand, Y.; Eljaafari, A. Human Mesenchymal Stem Cells Suppress Induction of Cytotoxic Response to Alloantigens. *Biorheology* **2004**, *41*, 469–476. [[PubMed](#)]
32. Yamazaki, T.; Akiba, H.; Iwai, H.; Matsuda, H.; Aoki, M.; Tanno, Y.; Shin, T.; Tsuchiya, H.; Pardoll, D.M.; Okumura, K.; et al. Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 5538–5545. [[CrossRef](#)]
33. Agata, Y.; Kawasaki, A.; Nishimura, H.; Ishida, Y.; Tsubata, T.; Yagita, H.; Honjo, T. Expression of the PD-1 Antigen on the Surface of Stimulated Mouse T and B Lymphocytes. *Int. Immunol.* **1996**, *8*, 765–772. [[CrossRef](#)]
34. Krummel, M.F.; Allison, J.P. CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T Cells to Stimulation. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 459–465. [[CrossRef](#)]
35. Freeman, G.J.; Long, A.J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L.J.; Malenkovich, N.; Okazaki, T.; Byrne, M.C.; et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1027–1034. [[CrossRef](#)]
36. Barber, D.L.; Wherry, E.J.; Masopust, D.; Zhu, B.; Allison, J.P.; Sharpe, A.H.; Freeman, G.J.; Ahmed, R. Restoring Function in Exhausted CD8 T Cells during Chronic Viral Infection. *Nature* **2006**, *439*, 682–687. [[CrossRef](#)]
37. Blackburn, S.D.; Crawford, A.; Shin, H.; Polley, A.; Freeman, G.J.; Wherry, E.J. Tissue-Specific Differences in PD-1 and PD-L1 Expression during Chronic Viral Infection: Implications for CD8 T-Cell Exhaustion. *J. Virol.* **2010**, *84*, 2078–2089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ibrahim, M.M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obes Rev.* **2010**, *11*, 11–18. [[CrossRef](#)]
39. Patel, V.B.; Mori, J.; McLean, B.A.; Basu, R.; Das, S.K.; Ramprasath, T.; Parajuli, N.; Penninger, J.M.; Grant, M.B.; Lopaschuk, G.D.; et al. ACE2 Deficiency Worsens Epicardial Adipose Tissue Inflammation and Cardiac Dysfunction in Response to Diet-Induced Obesity. *Diabetes* **2016**, *65*, 85–95. [[CrossRef](#)]
40. Nishimura, H.; Itamura, S.; Iwasaki, T.; Kurata, T.; Tashiro, M. Characterization of Human Influenza A (H5N1) Virus Infection in Mice: Neuro-, Pneumo- and Adipotropic Infection. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 2503–2510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Article 5 (en rédaction)

**Rôle de la voie Notch et de son ligand DNER dans l'inflammation liée à IL-17A et médiée par les cellules souches du tissu adipeux, chez le sujet obèse.**

Involvement of the Notch pathway and its ligand DNER in obesity-mediated inflammation of adipose tissues.

*Julien Pestel..... Assia Eljaafari.*



**Figure 26 : Structure des différentes isoformes du récepteur Notch.**

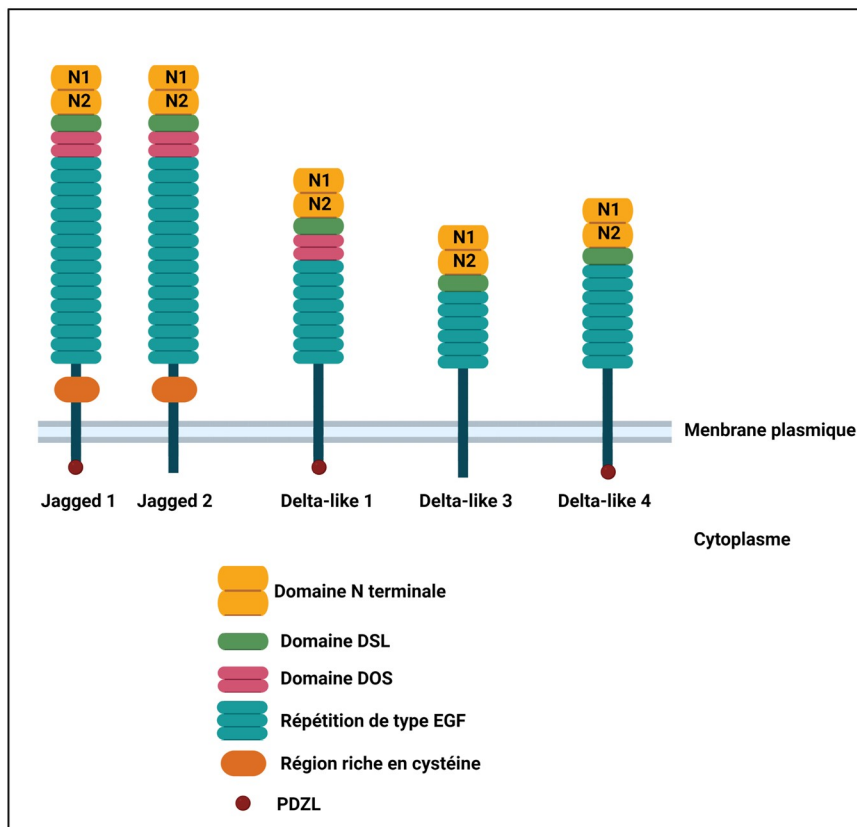
(A) NECD : Notch extracellular domain ; NRR : negative regulatory region ; NICD : Notch intracellular domain ; LNR : Lin 12/ Notch domain ; HD : heterodimerisation domain ; TMD : transmembrane domain ; RAM : RBP-Jk-associated molecule ; NLS : nuclear localization domain ; ANK : répétition ankyrines ; TAD : transcription activator domain ; PEST : Pro-Glu-Ser-Thr. (B) S1/2/3 : Site de clivage 1/2/3 du récepteur Notch

## **La voie de signalisation Notch et son rôle dans l'immunité**

La voie de signalisation Notch est une voie de communication intercellulaire majeure, très conservée durant l'évolution. Elle a été découverte en 1919 chez la femelle drosophile. En effet, une mutation hétérozygote du gène de Notch induit la formation d'une encoche sur l'aile des drosophiles. Le gène fut donc nommé Notch qui est le terme anglais pour encoche (Mohr, 1919). La voie Notch a par la suite été impliquée dans de nombreux processus du développement embryonnaire depuis l'oursin jusqu'à l'Homme. Au niveau cellulaire, l'activation de la voie Notch peut avoir de nombreuses conséquences telles que l'apoptose, la différenciation ou encore la prolifération et ce à tous les stades du développement dans de nombreux tissus ou organes (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). En particulier, la voie Notch est nécessaire au développement thymique des lymphocytes T (Pui et al., 1999), ainsi qu'à la polarisation de ces derniers, une fois présents en périphérie (Amsen et al., 2015).

### Les récepteurs et les ligands de la voie Notch

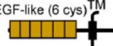

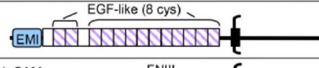
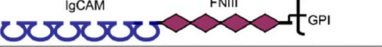




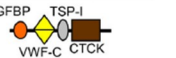


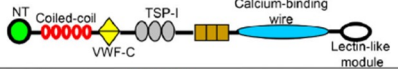
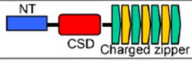
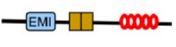
L'activation de la voie Notch est induite par la fixation d'un de ses ligands sur l'une des isoformes de son récepteur. Il existe 4 isoformes du récepteur Notch nommées Notch 1 à 4. Les récepteurs de la voie Notch sont des protéines transmembranaires de type I. Notch est en premier lieu traduit sous la forme d'un monomère, puis avant son intégration dans la membrane plasmique, le récepteur Notch subit un clivage post-traductionnel au niveau du site S1, situé à 70 acides aminés du domaine N terminal. (Clivage S1). Ce clivage est réalisé au sein de l'appareil de Golgi par une protéase de type furine (Logeat et al., 1998). Il en résulte un hétérodimère maintenu par des liaisons non covalentes dépendantes du calcium (Rand et al., 2000). Cet hétérodimère est constitué de deux polypeptides, le domaine extracellulaire nommé « Notch extracellular domain » (NECD) et le fragment transmembranaire. Ce dernier est constitué d'un court fragment de 70 acides aminés extracellulaires, du domaine transmembranaire et du « Notch intracellular domain » (NICD). NECD est constitué de 29 à 36



**Figure 27 : Structure des différents ligands canoniques de la voie de signalisation Notch.**

répétitions de type « epidermal growth factor » (EGF), le nombre de répétitions variant d'une isoforme de Notch à l'autre. Parmi toutes ces répétitions, les domaines EGF 11 et 12 sont les plus importants puisqu'ils suffisent à l'interaction ligand/récepteur (Hambleton et al., 2004; Rebay et al., 1993). Après le NECD se trouve la région « negative regulatory region » (NRR) composée de 3 domaines de type Lin 12/ Notch (LNR) riches en cystéines et du domaine d'hétérodimérisation (HD). C'est dans cette région que le clivage S1 a lieu et où le NECD est lié de façon non covalente au fragment transmembranaire. La région NRR est cruciale pour prévenir l'activation de la voie Notch en l'absence de ligand (Gordon et al., 2007). Lors de la fixation du ligand sur le récepteur Notch, la région NRR change de conformation, permettant l'accès au site de clivage 2 (clivage S2). Après la région NRR se trouve la partie transmembranaire qui contient le site de clivage 3 (clivage S3) nécessaire à la libération du dernier domaine de Notch, le NICD. NICD est composé d'un domaine « RBP-Jk-associated molecule » (RAM), de sept répétitions ankyrines liées à deux séquences de localisation nucléaire (NLS), d'un domaine d'activation de la transcription (TAD) et d'un domaine PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) (Chillakuri et al., 2012) (**Figure 26**). Le domaine RAM et les sept répétitions ankyrines sont impliquées dans l'interaction du NICD avec des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes cibles de Notch (Tamura et al., 1995). Le domaine TAD est retrouvé dans les isoformes 1 et 2 de Notch mais pas dans Notch 3/4. Enfin, le domaine PEST permet la régulation par dégradation protéolytique du NICD. L'absence de ce domaine est un facteur responsable de la leucémie lymphoblastique aiguë (Weng et al., 2004).

L'activation de la voie de signalisation Notch se fait principalement par la fixation d'un ligand de la famille DSL, le nom de cette famille provient d'un domaine présent au sein de ses ligands, le domaine Delta, Serrate et Lag2 (DSL) (Tax et al., 1994). Chez les mammifères les ligands DSL sont composés de 5 membres séparés en deux familles, Delta-like (Delta-like 1, 3 et 4, Dll1/3/4) et Jagged (Jagged 1 et 2) (**Figure 27**). Cette classification est faite par homologie aux 2 ligands présents chez la drosophile Delta et Serrate (Kopan, 2012). Les ligands DSL sont des protéines transmembranaires de type I composées d'une région N terminale suivie d'un domaine DSL et de nombreuses régions EGF disposées en tandem (liant ou non le calcium). Le domaine DSL est nécessaire à l'interaction entre ligand et récepteur mais il n'est pas suffisant (Shimizu et al., 1999). Des mutations au niveau de ce domaine sont associées à une perte de la signalisation de la voie Notch. Par exemple, les mutations de DSL dans le ligand Jagged 1 sont responsables chez l'Homme du syndrome d'Alagille (Warthen et al., 2006). Le syndrome

	Ligand	Ligand Structure	Notch-binding region of ligand	Ligand-binding region of Notch	Effect on Notch signaling	Proposed effector(s) of Notch signaling
INTEGRAL MEMBRANE-BOUND	Dlk-1/Pref-1		EGF1-2 or EGF5-6	EGF10-11 or EGF12-13	<i>cis</i> -inhibition/ <i>trans</i> -activation?	CSL
	DNER		DNER EGF1-2	Full-length*	<i>trans</i> -activation	CSL or Deltex
	Jedi		Not tested	Not tested	inhibition (as secreted protein)	CSL
GPLINKED MEMBRANE-BOUND	F3/Contactin1		Full-length*	EGF1-13, EGF 22-34	<i>trans</i> -activation	Deltex
	NB3/Contactin6		Full-length*	EGF22-34	<i>trans</i> -activation	Deltex
SECRETED	scabrous		Full-length*	Full-length*	<i>trans</i> -activation	CSL
	wingless		Full-length*	EGF19-36	<i>trans</i> -activation	Unknown
	OSM-11		Full-length*	EGF1-6	<i>trans</i> -activation	CSL
	CCN3/NOV		C-terminal cysteine knot	EGF repeats	<i>cis</i> -activation/ modulator?	CSL
	MAGP-2		Matrix binding domain	EGF repeats	<i>cis</i> -activation/ modulator?	CSL
	MAGP-1		Full-length*	Full-length*	<i>cis</i> -activation/ modulator?	CSL
	TSP2		Full-length*	EGF1-11	Agonist** ( <i>cis</i> )	CSL
	YB-1		Full-length*	EGF13-33	<i>cis</i> -activation	CSL
	EGFL7		Emilin domain and EGF1-2	EGF7-12 (N1, N2, N4), EGF6-11 (N3)	antagonist ( <i>cis</i> and <i>trans</i> )***, agonist ( <i>cis</i> )****	CSL

**Figure 28 : Structure des différents ligands non canoniques de la voie de signalisation Notch.**

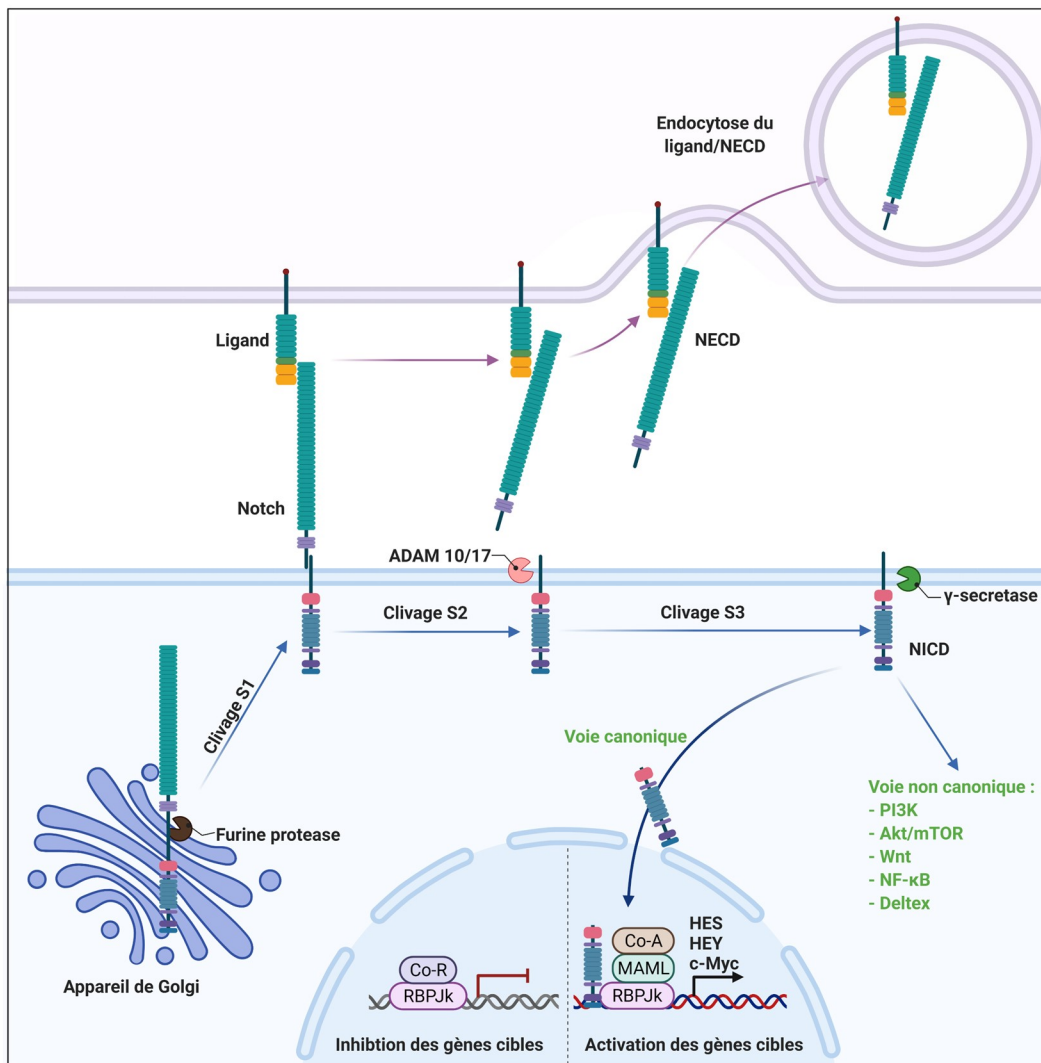
(Adapté d'après D'SOUZA et al., 2010)

d'Alagille est caractérisé par un défaut de développement des voies biliaires intra-hépatiques, d'une cardiopathie congénitale, d'un faciès caractéristique, d'une déformation typique des vertèbres et d'une anomalie oculaire typique. De plus, le domaine « Delta and OSM-11-like proteins » (DOS) a été identifié comme coopérant avec DSL pour permettre la liaison ligand/récepteur (Cordle et al., 2008). Ce domaine est retrouvé dans les ligands Dll1, Jagged 1 et Jagged 2. En plus des domaines DSL et DOS, le domaine N terminal semble conservé entre les différents ligands DSL. Il peut être subdivisé en deux régions N1 riche en cystéine et N2 dépourvue de cystéine (Parks et al., 2006). Ce domaine N terminal a son importance dans l'endocytose du ligand de Notch et une bonne signalisation de la voie Notch. Une mutation de ce domaine peut être responsable également du syndrome d'Alagille. A proximité de la membrane plasmique, se trouve un autre domaine riche en cystéines pour les ligands Jagged 1 et Jagged 2. Enfin, le domaine intracellulaire de ces ligands est celui qui présente le moins d'homologie entre les différents ligands et son rôle est encore mal défini. Il peut être ubiquitinylé, il peut également disposer d'un domaine « PSD-95/Dlg/ZO-1 » C terminal qui peut interagir avec le cytosquelette d'actine mais dont le rôle est lui aussi mal défini voir indépendant de la signalisation de Notch (Pintar et al., 2007).

Les ligands de la famille DSL correspondent aux ligands dits « canoniques » de la voie Notch, par opposition aux ligands « non canoniques » qui ne disposent pas de domaine DSL et ayant des formes et des domaines protéiques très variés. Les ligands non canoniques peuvent être des protéines transmembranaires, liées à la membrane par le glycosylphosphatidylinositol ou encore peuvent être des molécules sécrétées (D'SOUZA et al., 2010) (**Figure 28**). Parmi les ligands transmembranaires, il existe le « Delta/Notch-like EGF-related receptor » (DNER), dont la structure et les rôles seront détaillés dans les parties suivantes.

### L'activation de la voie Notch

La voie de signalisation Notch requiert un contact intercellulaire et repose sur l'interaction directe entre un ligand et le récepteur Notch. L'activation de la voie Notch implique une série de clivages protéolytiques successifs du récepteur (**Figure 29**). Le premier le clivage S1 a lieu avant l'interaction avec le ligand, lors de la synthèse du récepteur, il prédispose le récepteur à sa signalisation. Le clivage S2 est consécutif à la liaison du ligand sur



**Figure 29 : Activation canonique et non canonique de la voie de signalisation Notch.**

le récepteur. En effet, la liaison récepteur/ligand induit un changement de conformation de la région NRR permettant un accès au site S2. Ce serait l'induction de l'endocytose du ligand avec le NECD qui exercerait une force sur le domaine NRR afin de modifier sa conformation (Gordon et al., 2015). Une mutation de cette région empêche la NRR d'auto-inhiber la signalisation en absence de ligand, et induit donc une signalisation non régulée de Notch ayant pour conséquence une leucémie (Malecki et al., 2006). Le clivage S2 a lieu du côté extracellulaire et est catalysé par une « A-Disintegrin-And-Metalloprotéase » (ADAM10/17), ce clivage est suivi par le clivage S3 du côté intramembranaire grâce au complexe  $\gamma$ -sécrétase permettant la libération du NICD. Le complexe  $\gamma$ -sécrétase est constitué de 4 protéines : la préséniline, la nicastrin, l'antérieur pharynx-defective 1 (Aph-1), et la presenilin enhancer 2 (Pen-2). La préséniline est le composant possédant l'activité catalytique de la  $\gamma$ -sécrétase néanmoins toutes les protéines de ce complexe sont nécessaires à l'activité  $\gamma$ -sécrétase (Wolfe, 2019). Suite à sa libération dans le cytosol, le NICD est transloqué dans le noyau grâce à ses deux séquences NLS. Dans le noyau il va se complexer au niveau de son domaine RAM avec la protéine de liaison à l'ADN ; RBPJk aussi connue sous le nom de CSL (CBF1, Su(H), LAG1, d'après ses orthologues chez les mammifères, la drosophile et *C. elegans*). La liaison du NICD avec RBPJk permet le recrutement de Mastermind-like protein (MAML) (Nam et al., 2006). La liaison de ce complexe au niveau des promoteurs des gènes cibles de Notch induit leur expression. En absence de NICD, RBPJk est complexé avec des corépresseurs qui inhibent la transcription des cibles de Notch. Ils existent de nombreux gènes cibles de Notch, les mieux caractérisés sont les familles de facteurs de transcription à hélice-boucle-hélice « hairy and enhancer of split » (HES) et « Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein » (HEY). Ces gènes sont impliqués dans le devenir cellulaire (Bray and Bernard, 2010). D'autres cibles comme c-Myc ou encore la cycline D sont connues pour induire la prolifération cellulaire.

En plus de ce modèle d'activation, des études plus récentes rapportent un mode d'activation dit non canonique de la voie Notch, indépendant du ligand et de RBPJk. A la place, la voie Notch interagit avec les voies PI3K, mTORC2, AKT, Wnt, NF $\kappa$ B, ou HIF-1 $\alpha$  au niveau cytoplasmique et/ou nucléaire. La signalisation non canonique de la voie Notch est capable de réguler la survie, le métabolisme et la différenciation des cellules. En effet, les premières preuves de l'existence d'une voie non canonique de Notch proviennent de la recherche sur le cancer. Lors de l'utilisation d'inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase (GSI) sur des cellules tumorales,

toutes les actions de Notch n'étaient pas inhibées ce qui a permis de mettre en évidence une voie indépendante du clivage du NICD (Ayaz and Osborne, 2014). Par exemple, dans la leucémie aiguë lymphoblastique, Notch 3 est capable de maintenir l'activation de la voie NF- $\kappa$ B en interagissant avec IKK $\alpha$  (Vacca et al., 2006). La voie non canonique de Notch, dans le cas de cancers du col de l'utérus, est également capable d'induire l'activation de la voie PI3K (Veeraraghavalu et al., 2005). De plus, cette voie semble dépendre d'une protéine cytoplasmique, nommée Deltex (Yamamoto et al., 2001). Néanmoins son mode d'action n'est pas encore clairement établi. Deltex a été retrouvé localisé dans le noyau, il pourrait ainsi servir de facteur de transcription (Yamamoto et al., 2001). Cependant, l'expression de Deltex peut être induite par Notch. Deltex est également impliqué dans le rétrocontrôle négatif de la voie. En effet, Deltex participe à la formation de complexes protéiques trimériques NOTCH-Deltex- $\beta$ -arrestine, médiant la dégradation des récepteurs Notch par une voie dépendante de l'ubiquitination, puisque Deltex a une activité E3 ubiquitine ligase. Enfin, Deltex peut se lier avec le NICD et ainsi bloquer l'association de ce dernier avec RBPJk, inhibant ainsi l'expression des gènes cibles de la voie canonique de Notch (Zhang et al., 2010).

### Le ligand non-canonique DNER

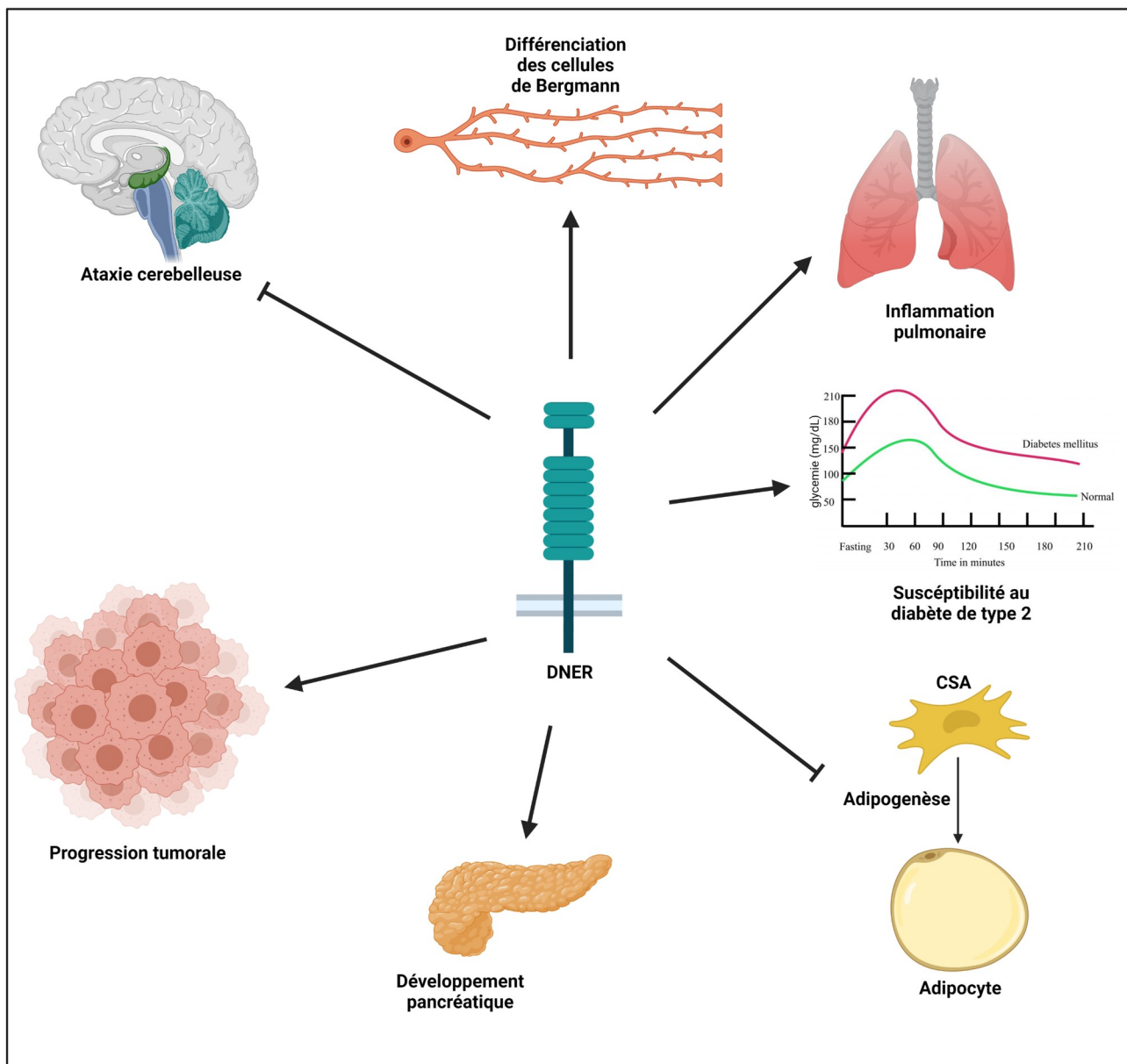
Parmi les ligands non canoniques de Notch se trouve le ligand DNER. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type I. Il a été initialement mis en évidence au niveau des dendrites et des corps cellulaires des neurones post mitotiques. Ce ligand est impliqué dans le développement et la maturation des neurones du système nerveux central. DNER est composé de 10 répétitions de domaine EGF dans sa partie extracellulaire et d'un court domaine cytoplasmique composé de tyrosine et de leucine (Eiraku et al., 2002). La même équipe a, quelques années plus tard, mis en évidence que DNER qui est fortement exprimé par les cellules de Purkinje, est capable d'interagir avec Notch et ainsi de servir de ligand dans le développement des cellules gliales de Bergmann (Eiraku et al., 2005). Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence que DNER est capable de se lier à Notch 1 dans les cellules de Bergmann et d'activer la signalisation canonique (via la  $\gamma$ -sécrétase) et non canonique (via Deltex) de Notch dans ces cellules. De plus, les auteurs ont montré que l'inhibition dans ces cellules de la voie non canonique inhibe leur développement, ce qui n'est pas le cas lors de l'inhibition de voie dépendante de la  $\gamma$ -sécrétase. DNER est donc crucial pour un

développement correct du cervelet. Pour preuve, des souris délétées du gène DNER présentent une ataxie cérébelleuse (Tohgo et al., 2006). De plus, chez des patients atteints eux aussi d'ataxie cérébelleuse, des auto-anticorps dirigés contre DNER ont été mis en évidence (de Graaff et al., 2012; Shen et al., 2021).

Par la suite, le rôle de DNER dans la progression de certains cancers a été rapporté. En effet, DNER pourrait servir d'oncogène en activant la prolifération, l'invasion et les métastases cellulaires dans les cancers de la prostate (Wang et al., 2017), le glioblastome (Sun et al., 2009), le carcinome hépatocellulaire (Y. Liang et al., 2018) ou encore le cancer du sein (L. Wang et al., 2019). DNER est surexprimé par les cellules cancéreuses de tumeurs mammaires. Il a été démontré qu'il régule la transition épithelio-mésenchymateuse et protège de l'apoptose les cellules du cancer du sein via l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -catenin. Une expression élevée de DNER et de  $\beta$ -catenin sont associées à une plus faible survie (Z. Wang et al., 2020). Dans le carcinome hépatocellulaire, il a été démontré que DNER induit une augmentation de la prolifération, de l'invasion et de la migration des cellules cancéreuses en activant la voie PI3K/Akt (Y. Liang et al., 2018).

De façon intéressante, il a également été montré que DNER est capable d'inhiber l'adipogenèse de CSA humaines et ce, en inhibant l'expression des facteurs de transcription de la famille C/EBP. En effet, l'inhibition de l'expression de DNER par ARN interférant induit une augmentation d'expression de gènes adipocytaires tels que : PPAR $\gamma$  ou FABP4 (Park et al., 2010a). DNER a également été mis en évidence grâce à des études à grande échelle sur le génome, comme étant un gène de susceptibilité au DT2 (Hanson et al., 2014a). De plus, la mutation d'une paire de base (SNP) du gène de DNER et/ou de Dll1, est également associée au risque de développer un DT2 (Deng et al., 2015). DNER a également été mis en évidence comme étant un marqueur du développement des progéniteurs  $\beta$ -pancréatiques (Hald et al., 2012a).

Enfin, très récemment il a été démontré que DNER est impliqué dans l'inflammation chronique. En effet, l'expression de DNER est augmentée au cours de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Ballester-López et al., 2019). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que l'expression de DNER est induite dans les poumons des patients atteints de BPCO et chez des souris soumises à de la fumée de cigarette pendant 6 mois. Ils ont par la suite démontré que DNER est capable de se lier à Notch 1. Dans ce modèle, la voie Notch interagit avec la voie NF $\kappa$ B et induit l'expression d'IFN $\gamma$  par les macrophages de type 1 recrutés au sein



**Figure 30 : Principaux rôles connus du ligand, DNER.**

du tissu pulmonaire. De plus, une autre étude a montré que l'expression de DNER augmente dans les poumons de patients fumeurs. DNER est également un biomarqueur de l'inflammation lié au syndrome de Parkinson (Jabbari et al., 2019). De plus, il a été montré par « RNAsequencing », que la stimulation de CSA par le TNF $\alpha$  induit l'expression de 25 gènes liés à l'inflammation et le remodelage tissulaire, notamment DNER (Ting et al., 2021). Une étude a mis en avant le potentiel rôle de biomarqueurs inflammatoires de DNER dans les polyneuropathies motrices associées à l'obésité générale et abdominale (Herder et al., 2018; Schlesinger et al., 2019). De plus, il a été démontré que l'expression de DNER mesurée dans le liquide cébrospinal, de patients subissant des interventions chirurgicales de routine, est corrélé avec l'IMC (Larsson et al., 2015) (**Figure 30**).

### Rôle de la voie Notch dans la polarisation et le développement des lymphocytes T

Toutes les cellules du système immunitaire proviennent des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Les HSC peuvent se différencier en progéniteurs lymphoïdes communs qui pourront par la suite devenir des lymphocytes B ou T selon les stimuli reçus par les cellules. Si les progéniteurs lymphoïdes communs migrent vers le thymus, ils seront voués à devenir des lymphocytes T. L'implication de la voie Notch dans certaines étapes clés du développement des lymphocytes T a été mise en évidence (Vijayaraghavan and Osborne, 2018). En effet, suite à leur arrivée dans le thymus, les progéniteurs lymphoïdes, appelés lymphocytes doubles négatifs (DN), puisqu'ils n'expriment ni les molécules CD4 ni les molécules CD8, vont suivre un cycle de 4 stades DN1 à DN4, au cours desquels des réarrangements du TCR se produisent. L'interaction entre Dll4, exprimé par les cellules épithéliales thymiques, et Notch au niveau des lymphocytes DN permet leur différenciation progressive. Ainsi le passage du stade DN à DN1 et DN1 à DN2 et enfin DN2 à DN3 nécessite l'expression par les cellules stromales thymiques de Dll4 et induit ainsi l'activation de la voie Notch dans les cellules DN (Rothenberg et al., 2016; Schmitt et al., 2004; Schmitt and Zúñiga-Pflücker, 2002). Les cellules DN3 deviennent par la suite DN4. Elles sont nommées doubles positives car elles expriment à la fois les molécules CD4 et CD8. La voie de signalisation Notch semble également impliquée dans le passage du stade double positif vers le simple positif CD4 ou CD8. En effet, l'expression d'une forme constitutivement active de Notch dans des thymocytes double positifs induit une différenciation en lymphocytes CD8<sup>+</sup> (Robey et al., 1996). Cependant, dans une autre étude, la

délétion de Notch 1 dans des thymocytes de souris n'a conclu à aucun impact de cette délétion vers la différenciation en lymphocytes CD4+ ou CD8+ (Wolfer et al., 2001).

La voie de signalisation Notch est également impliquée dans la polarisation des lymphocytes T CD4+ naïfs en périphérie. En premier lieu, il a été mis en évidence que l'interaction entre Dll1 et Notch 3 induit la polarisation des lymphocytes T en Th1. En effet, l'utilisation du ligand Dll1 soluble a induit la production d'IFN $\gamma$  ainsi que l'expression du facteur de transcription spécifique des Th1, TBX21. Ceci est conforté par la surexpression de Notch 3 dans les lymphocytes naïfs, à l'aide d'un rétrovirus qui induit une forte sécrétion d'IFN $\gamma$  associée à une diminution de l'IL-4 (Maekawa et al., 2003). *In vivo*, dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune caractérisé par la présence de nombreux lymphocytes Th1, l'injection de GSI a réduit significativement les symptômes chez ces souris. De plus, les auteurs ont démontré *in vitro* que Notch 1 régule directement l'expression du facteur de transcription TBX21, puisque le NICD associé à RBPJk se fixe directement sur le promoteur de TBX21 (Minter et al., 2005). Enfin, dans des PBMC de patients atteints d'anémie aplasique, une pathologie liée aux lymphocytes Th1, NICD a aussi été retrouvé fixé au promoteur de TBX21 (Roderick et al., 2013) et le traitement de ces mêmes PBMC avec un GSI a permis de réduire l'expression de TBX21. La voie Notch est également impliquée dans la polarisation des lymphocytes Th2. En effet, une étude a montré que l'expression de Dll1 ou de Jagged1 par les cellules présentatrices d'antigène, induit respectivement la polarisation des lymphocytes en Th1 ou en Th2 (Amsen et al., 2004). Les auteurs rapportent que l'activation canonique de la voie Notch est nécessaire à la polarisation Th2, notamment en induisant l'expression de GATA3 et en régulant directement l'expression de l'IL-4. D'autres publications ont confirmé l'implication de Notch dans l'expression de GATA3 en démontrant l'interaction NICD/ RBPJk au niveau du promoteur de GATA3. De plus, la délétion de GATA3 a démontré que dans ce cas Notch n'induit plus la polarisation en lymphocytes Th2 mais cette fois en Th1 (Amsen et al., 2007; Fang et al., 2007).

La voie de signalisation Notch permet également de polariser les lymphocytes vers le sous-type Th17. Une étude a montré que l'expression de Dll4 induite dans les DC, par la stimulation via le LPS, en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$ , induit la production d'IL-17 par des lymphocytes T (Mukherjee et al., 2009). Dans cette même étude, l'utilisation d'un GSI a permis d'inhiber la production d'IL-17 alors même que la protéine recombinante de Dll4 était présente, ce qui confirme le rôle de l'activation de la voie Notch par Dll4, dans la polarisation des lymphocytes Th17. Les mêmes auteurs ont montré que RBPJk est capable de se fixer

directement au niveau des promoteurs de RORC et de l'IL-17 en réponse à l'activation de Notch par Dll4. De plus, dans une autre étude l'utilisation de GSI ou de siRNA dirigés contre Notch a permis d'inhiber la sécrétion d'IL-17 et la polarisation des lymphocytes T en Th17 chez la souris mais également chez l'Homme. La même étude a montré que le NICD est capable de se fixer directement sur les promoteurs de l'IL-17 et de RORC et ce, en utilisant un vecteur surexprimant le NICD (Keerthivasan et al., 2011). De plus, dans un modèle murin de psoriasis caractérisé par la présence de lymphocytes Th17 pathogéniques, l'utilisation d'un GSI a permis de diminuer le pourcentage de Th17 pathogéniques au niveau des lésions ainsi que la concentration d'IL-17A sérique chez les souris traitées (Y. Wang et al., 2020).

Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques ont également besoin de la voie Notch pour leur différenciation. En effet, la surexpression de Dll1 au sein des DC induit une augmentation de la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques en activant le récepteur Notch 2 au sein des lymphocytes. Dans la même étude, il a été montré que le NICD de Notch 2 est capable de se fixer avec des co-activateurs, au niveau du promoteur du granzyme B afin d'induire sa transcription (Maekawa et al., 2008). De plus, l'absence de Notch 2 chez des souris ayant été inoculées avec des cellules cancéreuses, a démontré un rôle essentiel de ce dernier dans la réponse cytotoxique vis-à-vis de tumeur (Sugimoto et al., 2010). En accord avec ces résultats, une étude a montré que le GSI induit une diminution d'expression de perforine et de granzyme B par des lymphocytes CD8 cytotoxiques (Cho et al., 2009).

## Implication de la voie Notch dans les complications métaboliques et l'inflammation liés à l'obésité

### Implication de la voie Notch au niveau hépatique

Il a été démontré que l'hyperactivation de la voie de signalisation Notch dans les hépatocytes induit une augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse conduisant alors à une hyperglycémie. De plus, il a été observé que la voie Notch est hyperactivée dans le foie des modèles de souris obèses (Valenti et al., 2013). L'effet activateur de la voie Notch sur la production de glucose dans le foie passe principalement par la fixation du NICD et de FoxO1 (un facteur de transcription) sur le gène de la sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase, enzyme limitante de la glycogénolyse et la néoglucogenèse. L'activation de la

voie Notch 1 via la surexpression du NICD dans le foie induit l'expression de la glucose-6-phosphatase et exacerbe l'insulino-résistance. L'inhibition par un GSI améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline de souris nourries avec un régime hypercalorique (Pajvani et al., 2011). De plus, le niveau d'activation de la voie Notch est corrélé à la résistance à l'insuline chez la souris et chez l'Homme (Valenti et al., 2013). La voie Notch a également un impact sur le phénotype des macrophages présents dans le foie. En effet, son activation induit l'expression de marqueurs phénotypiques des macrophages M1 hépatiques (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , iNOS). De plus, la stimulation par le LPS de macrophages hépatiques délétés pour Notch 1 induit une diminution de l'expression de ces marqueurs pro-inflammatoires en comparaison aux macrophages provenant de souris sauvages et induit une diminution de l'inflammation hépatique globale (Xu et al., 2015). Enfin, la libération ciblée de GSI dans le foie de souris obèses induit une diminution de l'inflammation hépatique, notamment en diminuant l'expression de MCP-1 et de CD45 (marqueurs des cellules hématopoïétiques) et la présence de macrophages (Richter et al., 2020).

#### Implication de la voie Notch au niveau du tissu adipeux

Au niveau du tissu adipeux, il a récemment été rapporté que l'inhibition de la voie Notch joue un rôle dans la conversion des adipocytes blancs en adipocytes beiges *in vivo* et de fait, améliore le phénotype de souris obèses. En effet, la délétion de Notch 1 ou de RBPJ dans un modèle murin, diminue la quantité de tissu adipeux blanc, augmente la présence d'adipocytes beiges par l'augmentation d'expression de UCP-1 et améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline (Bi et al., 2014). De plus, les souris délétées pour ces gènes présentes un « browning » accéléré en réponse au froid par rapport aux souris sauvages. D'un point de vue mécanistique, la voie Notch induit l'expression de Hes1 qui inhibe celle de Prdm16, Ppargc1a et Ppar $\gamma$ . Ces trois gènes sont des activateurs de la production d'UCP-1. De plus, chez des souris sauvages obèses, l'injection intrapéritonéale d'un GSI réduit la quantité de tissu adipeux et le poids de ces souris. La voie Notch a également un effet sur la polarisation des macrophages présents au sein du tissu adipeux. La voie de signalisation Notch est activée dans le tissu adipeux des animaux soumis à un régime hypercalorique (Bi et al., 2014). De plus, il a été démontré que l'activation de la voie Notch induit la polarisation des macrophages du tissu adipeux en macrophages M1 et ce, via la synthèse de IRF8 et l'activation de NF- $\kappa$ B. De plus, l'inhibition d'expression de JMJD3 via la voie Notch inhibe la polarisation vers les macrophages M2 (Appari et al., 2018).

### Implication de la voie Notch au niveau musculaire

L'interaction entre Notch et FoxO1 a également son importance dans le métabolisme musculaire. En effet, la délétion spécifique dans le muscle de ce gène promeut la conversion des fibres lentes à métabolisme oxydatif vers les fibres rapides glycolytiques (Kitamura et al., 2007). Or, en utilisant des souris hétérozygotes pour FoxO1 et pour Notch 1 (c'est-à-dire ayant un seul allèle fonctionnel de ces gènes), Pajvani et son équipe ont montré que durant un clamp euglycémique hyperinsulinémique, ces souris présentent une amélioration considérable de l'entrée de glucose dans les cellules musculaires, en comparaison aux souris sauvages (Pajvani et al., 2011). A l'inverse, la surexpression de Notch 1 induit une résistance à l'insuline. De plus, le rôle de « Delta like non-canonical Notch ligand 1 » (Dlk1) (un ligand non canonique de Notch) dans l'inhibition de l'entrée de glucose musculaire et l'insulino-résistance, a été mis évidence. En effet, des souris délétées pour Dlk1 et soumises à un régime hypercalorique, présentent une diminution de la taille des adipocytes et du pourcentage de graisse corporelle par rapport aux souris sauvages. De plus, cette délétion protège contre l'insulino résistance. Ces effets, semblent médiés par l'augmentation par Dlk1 de la translocation de GLUT4 et donc de l'entrée de glucose. De manière intéressante, l'expression de Dlk1 est corrélée à la masse graisseuse et à l'insulino-résistance, chez l'Homme (Jensen et al., 2019).

### Implication de la voie Notch au niveau vasculaire

La voie de signalisation Notch participe également à l'inflammation chronique au niveau vasculaire. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire aggravée par l'obésité, au cours de laquelle des lipides s'accumulent au sein des parois artérielles. De plus, au cours de cette pathologie, des macrophages infiltrent les plaques d'athérome ce qui a pour effet d'exacerber l'inflammation dans ces zones. Des études ont montré que la voie de signalisation Notch était activée dans les cellules endothéliales lumenales aortiques au niveau des lésions d'athérosclérose chez l'Homme. Ces cellules une fois la voie Notch activée, expriment des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8, IL-1 $\beta$ , ou encore des molécules d'adhésion comme ICAM-1 (Liu et al., 2012). Le ligand de Notch, Dll4 semble impliqué dans ce processus. En effet, le blocage de l'interaction Dll4/Notch à l'aide d'anticorps dirigés contre Dll4 a permis de diminuer le développement de l'athérosclérose chez ces souris. De plus, ce même traitement a permis de diminuer, également, la calcification des plaques d'athérome, et

de diminuer la résistance à l'insuline chez les mêmes souris soumises à un régime hypercalorique (Fukuda et al., 2012). Dans la même étude, l'inhibition de la signalisation induite par Dll4 a permis de diminuer l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux de ces souris elle-même médiée par une diminution de l'expression de MCP-1. Le même traitement a également induit une diminution de la masse de tissu adipeux sous-cutané et viscéral. Une autre étude a utilisé un modèle murin d'athérosclérose dans lequel les souris déficientes en apolipoprotéine E sont nourries avec un régime hypercalorique. L'utilisation d'un GSI a induit une diminution de l'accumulation de graisse au niveau aortique chez ces souris. De plus, ce traitement a permis de supprimer l'activité migratoire des macrophages péritonéaux murins primaires et de réduire l'expression d'ICAM-1 par ces macrophages, entraînant une diminution significative de l'infiltration des macrophages dans les plaques d'athéromes chez la souris (Aoyama et al., 2009).

## B. Article

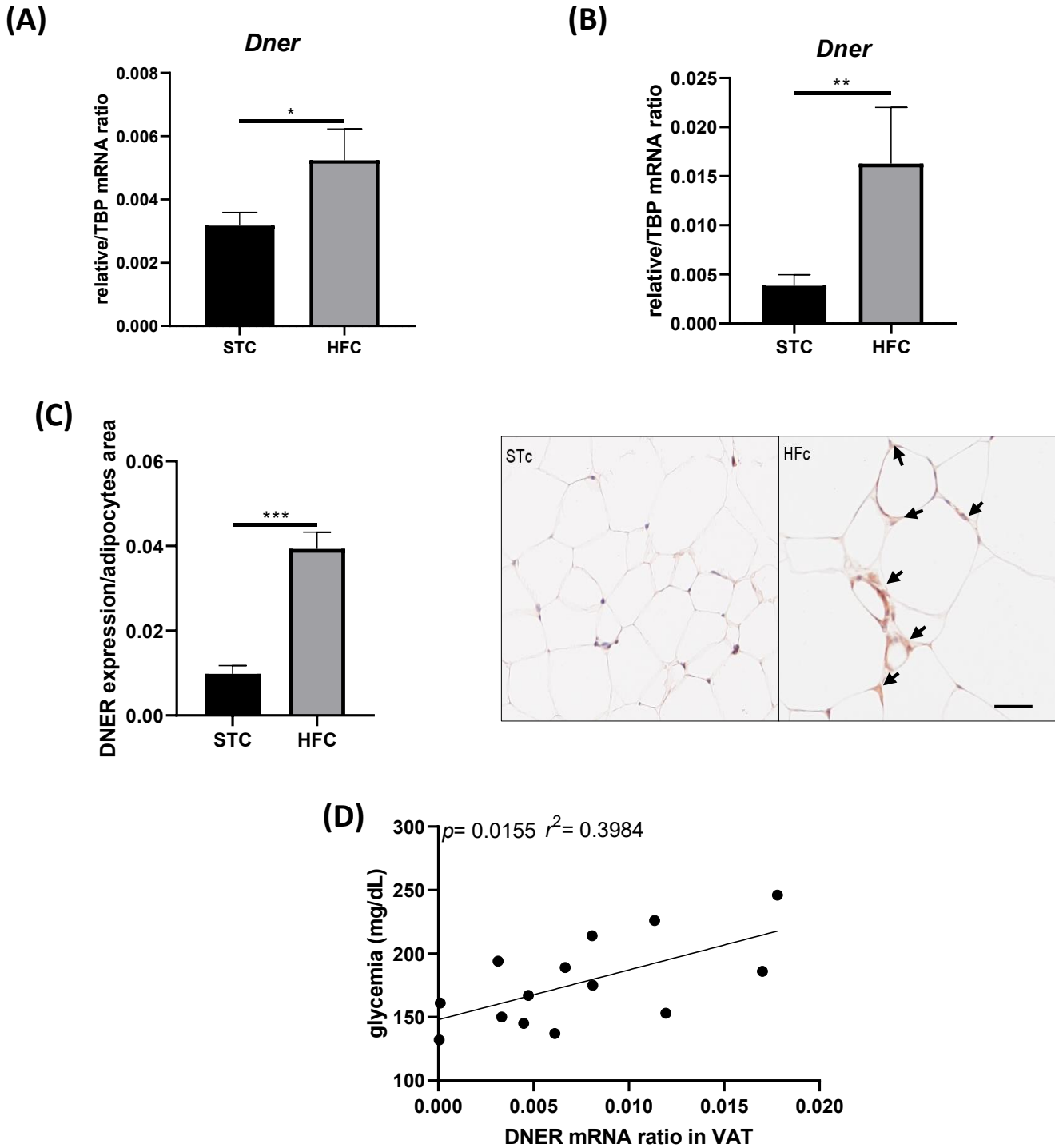
### INTRODUCTION

Overweight and obesity are defined as excessive fat accumulation and can represent a danger for health. According to the World health organization, in 2016 more than 1.9 billion adults (Body mass index (BMI)  $\geq 25$ ) were overweight and 650 million of them were obese (BMI  $\geq 30$ ). Obesity and overweight can induce severe complications such as type 2 diabetes (T2D), hyperlipidemia, atherosclerosis and hypertension. Moreover, obesity is also associated with various types of cancer (Berger, 2018), chronic inflammatory diseases and autoimmune diseases. During obesity, adipose tissue (AT) is progressively infiltrated by immune cells, which substitute to resident cells. Indeed, lean AT is infiltrated by M2 macrophages and Tregs. At an advanced stage, obese AT is progressively infiltrated with proinflammatory immune cells, such as: CD4+ Th1 cells, CD8+ T-cells and macrophages (M1). CD8+ T-cells infiltrate AT before macrophages and play a role in macrophage recruitment and activation. Indeed, genetic depletion of CD8+ T-cells has been shown to decrease macrophage recruitment and AT inflammation (Nishimura et al., 2009). In addition to Th1 cells, Th17 cells, which secrete IL17A/F, a cytokine able to spread inflammation towards other tissues and organs, have also demonstrated their implication in AT inflammation. Thus, these cells contribute to the

development of a proinflammatory environment in AT, leading to chronic inflammation. Such an inflammation induces a decrease in adipocyte insulin sensitivity, an impairment of adipogenesis and participates to the establishment of T2D. Our team has previously demonstrated a leading role of ASCs from obese individuals (ob-ASC) in AT inflammation by demonstrating that ob-ASC polarize T cells towards the Th17 cell subset (Eljaafari et al., 2015b). The investigation of the molecular mechanisms responsible for the activation of Th17 by obese ASCs led us to demonstrate that inter-cellular interactions may play an important role, since transwells between obASC and immune cells, as well as anti-ICAM-1 antibodies, inhibited Th17 cell activation (Eljaafari et al., 2015, Pestel, 2020).

NOTCH receptors belong to a family of 4 transmembrane glycoproteins involved in the transcriptional activation of genes implicated in progenitor cell self-renewal (Steinbuck and Winandy, 2018). They have been shown to be involved in several developmental processes, such as somitogenesis or neurogenesis (Pourquié, 2000). NOTCH is also implicated in insulin sensitivity and inter-cellular communications between mesenchymal stem cells and dendritic cells (Li et al., 2008). The NOTCH signaling pathway is activated subsequently to the binding of ligands located at the membrane of a neighboring cell with NOTCH receptors. NOTCH ligands are classified in two categories i.e: canonical or non-canonical. The canonical ligands induce the activation of NOTCH pathway through a series of proteolytic cleavages to release the NOTCH intercellular domain (NICD). Thus, when a canonical ligand binds to the NOTCH receptor, the extracellular domain of the Notch receptor is cleaved by ADAM 10/17 metalloproteinases. Then, the transmembrane domain is cleaved by the gamma-secretase complex (comprised of presenilin-1/2, nicastrin, PEN-2 and Aph-1) (Kopan and Ilagan, 2009). This allows the NICD to translocate into the nucleus where it binds with adapter proteins called RBPJk and Mastermind. This complex is then able to activate the transcription of NOTCH target genes (Hes1, Hey, c-Myc) (D'SOUZA et al., 2010). Another contribution of NOTCH is in the polarization of T lymphocytes, especially toward the Th17 cell subset (Shibata et al., 2011). Thus, gamma secretase inhibition in an experimental model of autoimmune uveitis and in a model of obese asthmatic mice have demonstrated the involvement of NOTCH in the polarization of Th17 cells (Yin et al., 2020; Zeng et al., 2019).

Delta/Notch-like EGF-related receptor (DNER) is a type I transmembrane protein containing 10 EGF-like repeats in the extracellular domain, and is a non-canonical ligand of the Notch pathway. DNER has been first described to play a role in cerebellum development (Eiraku et al., 2005; Tohgo et al., 2006), but was further shown to i) modulate adipogenesis (Park et al., 2010b), ii) be encoded by T2D susceptibility gene (Hanson et al., 2014b) and iii) be a marker



**Figure 1 : Upregulation of DNER expression in both sub-cutaneous and visceral AT in mice fed with a hypercaloric diet.** (A) *Dner* mRNA expression in VAT of mice submitted to a hypercaloric or chow diet. (B) *Dner* mRNA expression in SAT, (C) Immunochemistry staining of DNER in VAT of mice submitted to a hypercaloric diet (HFC) or chow (STC). (D) Correlation between glycemia (mg/dL). Values are expressed as mean +/- SEM, (A-B) n=7-8 and (C) n=5 mice/group, \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ .

of endocrine progenitors in the pancreas (Hald et al., 2012b). In addition, DNER has been described to be involved in cancer progression (Sun et al., 2009; Wang et al., 2017). More recently, DNER has been demonstrated to be a proinflammatory gene, able to activate IFN $\gamma$  secretion in the chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Ballester-López et al., 2019).

Therefore, our hypothesis was that DNER interaction with NOTCH receptor could contribute to initiate AT inflammation in subjects with obesity. To investigate this issue, *in vivo* experiments were performed using an experimental model of mice deleted from the DNER gene and fed with a hypercaloric diet. Moreover, an *in vitro* co-culture model with human ASC from obese individuals and MNC, leading to Th17 cell polarization was used. Finally, the gamma secretase inhibitor, a specific inhibitor of NOTCH1, and siRNA against DNER were used to analyze the contributions of the NOTCH pathway and DNER, in ASC-mediated Th17 cell polarization.

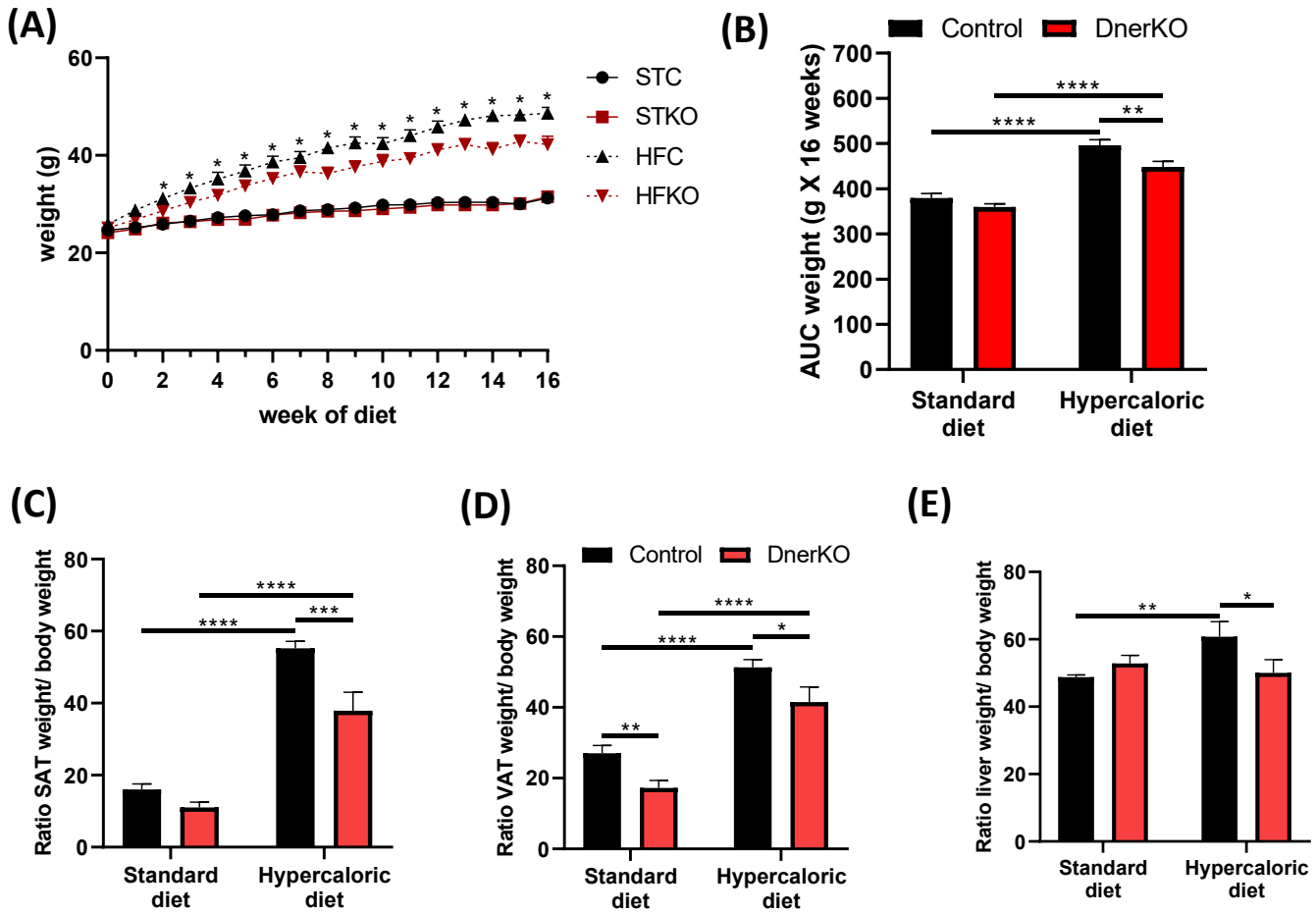
## **RESULTS**

### **Upregulation of DNER expression in both sub-cutaneous and visceral AT in mice fed with a hypercaloric diet.**

We first measured the mRNA expression levels of DNER in a C57BL/6 mouse model fed with a hypercaloric (HFC) or chow diet (STC) for 16 weeks in white adipose tissues (WAT). DNER mRNA expression was increased in both subcutaneous and visceral white adipose tissue (SAT, and VAT, respectively) of HFC mice as compared to STC mice (Figure 1A and 1B). Supporting these results, immunohistochemistry of WAT from HFC mice demonstrated a significant increase of DNER cellular expression (Figure 1C). Thus, these results suggested that DNER expression level may be positively associated with adipose tissue mass. Furthermore, a significant correlation between DNER mRNA expression in VAT and glycaemia was observed, supporting also a role for DNER in glucose metabolism (Figure 1D).

### **Metabolic phenotyping of male mice deleted from the Dner gene and fed a hypercaloric diet.**

To investigate whether DNER is involved in obesity and glucose metabolism alteration, we then used mice deleted for the DNER gene (DNERKO) and analyzed their metabolism after 16 weeks of hyper- or normo-caloric diet. As control, 2 groups of wild-type mice were fed with the same diets. The weights of DNERKO and WT mice were quite similar, during the 16-week feeding with a normo-caloric diet (Figure 2A). As expected, feeding WT mice with a

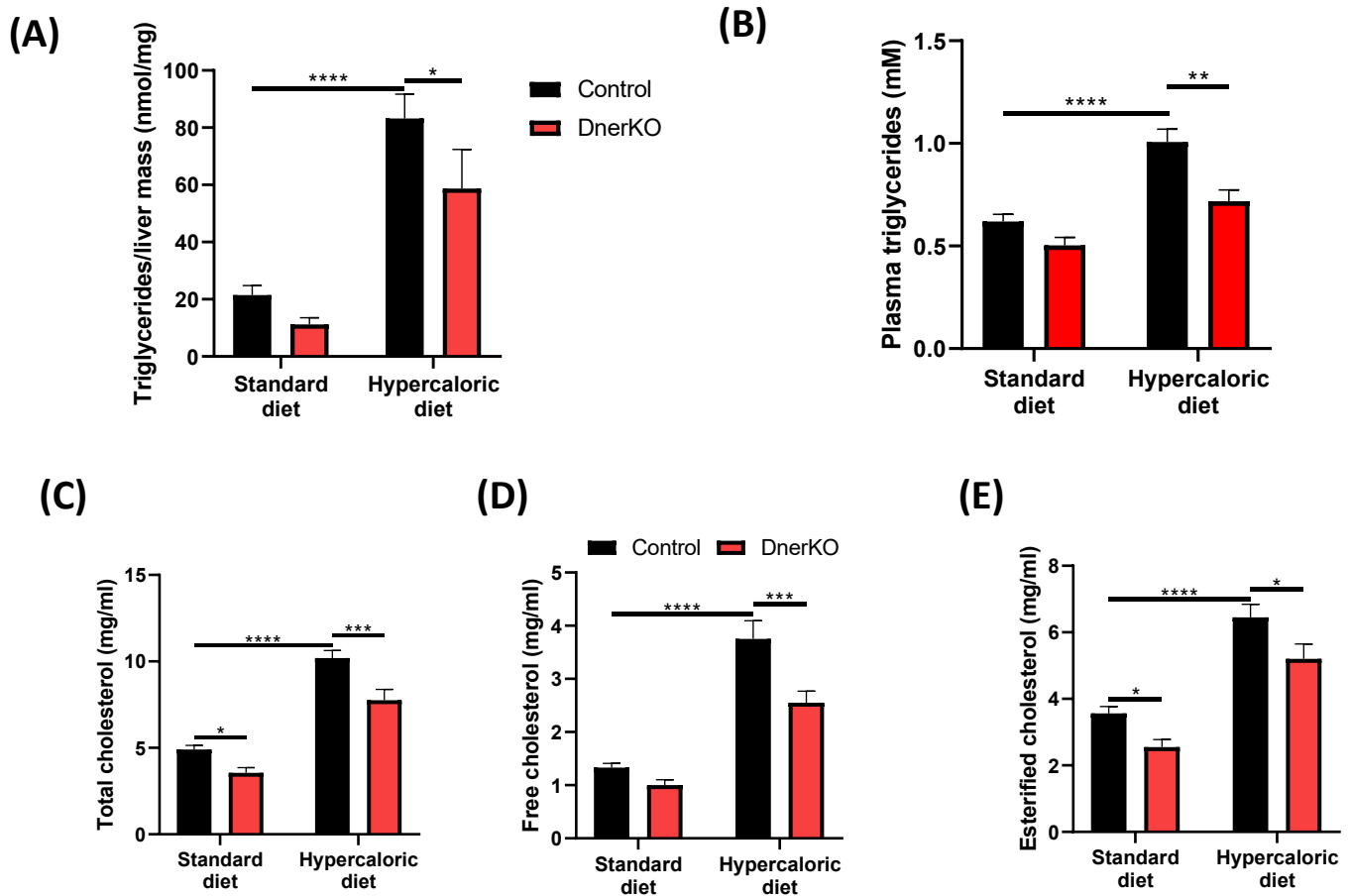


**Figure 2 : DNER deletion reduces body, adipose tissue weight and liver weight of mice fed with a hypercaloric diet.** (A) Body weight and (B) corresponding area under the curve. (C) Weight of VAT, (D) SAT (E) and liver measured at the end of the protocols. Values are expressed as mean +/- SEM, n= 11-18 mice/group, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\* p<0,0001.

hypercaloric diet resulted in a progressive increase of body weight throughout the duration of the challenge. However, DNERKO mice fed a hypercaloric diet (HFKO) gained less weight during the 16 weeks of the hypercaloric diet than HFC mice, with significant effects observed from the first week of the diet challenge (Fig. 2A). This was supported by the curves of body weight gain (Supplementary Figure 1). The significant 22 % reduction of body weight observed at the end of the 16 week-period of the hypercaloric feeding challenge, as shown by the area under curve (Figure 2B) was associated with a significant reduction of adipose tissue mass, in both SAT and VAT (Fig. 2C and 2D). We also observed a significant reduction of VAT mass in DNERKO mice fed with a standard feeding condition (STKO) (Figure 2C), suggesting that DNER is likely involved in VAT and SAT weight gain and in VAT mass regulation, as well. Interestingly, as opposed to what was observed in HFC, the relative liver weight in HFKO mice was not enhanced in response to the high-fat feeding (Figure 2E), as compared to SFKO, and was significantly lower than that of HFC mice, suggesting a putative impact on liver steatosis. This was confirmed by the measurement of liver triglycerides (TG), which accumulation was reduced in HFKO versus HFC mice (Figure 3A).

Consistent with the reduced TG liver content, plasma TG as well as total, free and esterified cholesterol levels, were significantly reduced in HFKO mice as compared to HFC mice (Figures 3B-E). Total and esterified cholesterol were likewise significantly decreased in STKO versus STC mice (Figure 3C and 3E), suggesting thus a key role of DNER in the physiological regulation of lipemia.

We further characterized the DNERKO mice to determine their glucose tolerance and insulin sensitivity. To this end, fasted mice were challenged with a bolus of glucose and glycaemia was measured each 15 min for 90 min. Insulinemia was measured at its peak (15 min after the bolus of glucose). DNERKO mice fed the high-fat diet and fasted for 6 h did not exhibit hyperglycaemia, as opposed to HFC mice (Figure 4A). Moreover HFKO were significantly less intolerant to glucose than HFC mice following 14 weeks of hypercaloric diet (Figure 4B and C). In addition, fasting insulinemia and glucose-induced insulinemic peak at 15 min were lower in HFKO, as compared to HFC mice, suggesting a better glycemic response in DNERKO fed a high fat diet (Fig. 4D and 4E). These data are consistent with the significantly reduced HOMA-IR in HFKO, as compared to HFC mice (Figure 4F). Thus, these data indicate that DNERKO mice fed a high fat diet had better glucose tolerance and insulin sensitivity than WT littermates. Collectively metabolic phenotyping of DNERKO male mice suggests an active contribution of DNER in obesity-mediated alteration of glucose and lipid metabolisms.



**Figure 3 : DNER deletion reduces hepatic triglycerides and circulating cholesterol of mice fed with a hypercaloric diet.** (A) Hepatic triglycerides concentration. (B) Circulating fasting triglycerides concentration. (C) Total plasmatic cholesterol concentration (D) free and (E) esterified plasmatic cholesterol concentration. Values are expressed as mean +/- SEM, n= 11-18 mice/group, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\* p<0,0001.

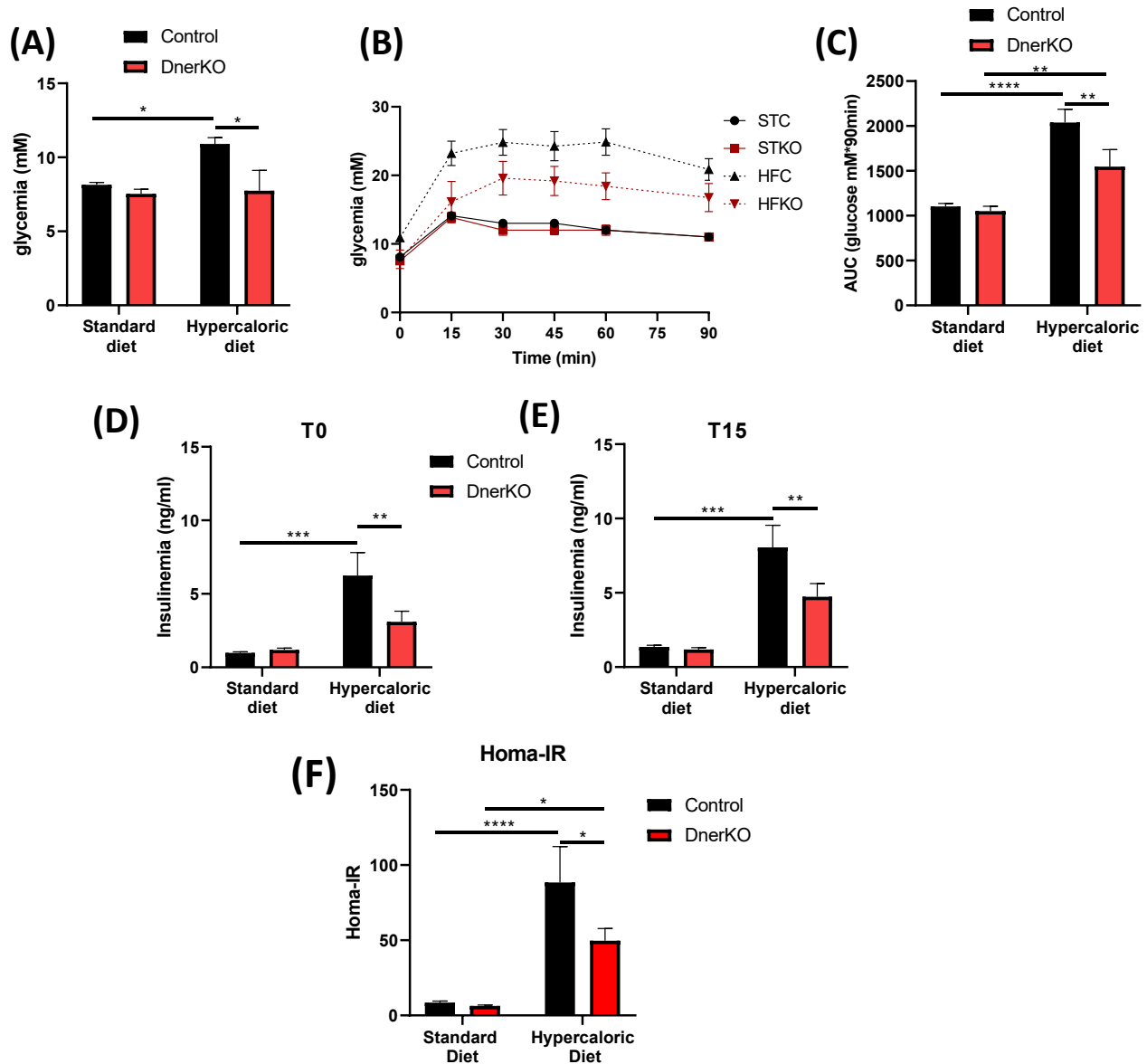
### **DNER is involved in adipose tissue inflammation and immune cell infiltration in mice fed with a hypercaloric diet.**

Obesity is known to induce an infiltration of AT by pro-inflammatory immune cells, resulting in AT inflammation. Therefore, we compared gene expression of various pro-inflammatory cytokines in VAT and SAT of DNERKO and WT mice. The hypercaloric diet resulted in increased mRNA expression levels of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in SAT and VAT, and of IL-6 in VAT, in WT mice, as compared to STC mice (Figure 5A-B). In HFKO mice, a downregulation of IFN $\gamma$  mRNA expression was observed in both SAT and VAT, as compared to HFC mRNA levels (Figure 5A-B). However, TNF $\alpha$  decreased in SAT, but not VAT, probably due to the highest levels of its expression in VAT. Moreover, a trend towards a decrease in IL-6 was observed in VAT of HFKO mice, as compared to HFC mRNA levels. (Figure 5A and 5B). Thus these results suggested a role for DNER in obesity-mediated proinflammatory cytokine secretion among AT. Because AT inflammation occurs subsequently to infiltration by inflammatory immune cells especially in VAT, we then measured VAT macrophage infiltration by labelling AT with markers for the total, or M1 macrophage population, i.e: F4/80, or CD86, respectively. As expected, an increase in these two markers was observed in VAT of HFC, as compared to STC mice. But, HFKO VAT displayed a significant decrease in these two markers, as compared to HFC VAT levels. Moreover, and as expected, CD8+ T cells infiltrated HFC- at higher levels than STC-VAT, but were less present in HFKO, as compared to HFC-VAT (Figure 5C to 5E). Thus, altogether, these results demonstrate the contribution of DNER in adipose tissue inflammation and immune cell infiltration, subsequently to an overfeeding challenge of 16 weeks.

### **DNER contributes to ob-ASC-mediated Th17 cell polarization in a human *in-vitro* co-culture model.**

To confirm and extend these data in human, we then investigated the contribution of DNER in a model mimicking AT infiltration by immune cells and resulting in inflammation. Indeed, by using a co-culture model with human ob-ASC and MNC, and as shown in figures 6A and B, we have reported that ob-ASC mediate IL-17A secretion, together with inhibiting TNF $\alpha$  secretion, resulting in Th17 cell polarization (Eljaafari et al., 2015b).

To thus address whether DNER was involved in ob-ASC mediated Th17 cell polarization, we transfected ob-ASC with a siRNA targeting DNER, and used these transfected cells in co-



**Figure 4 : DNER deletion improves glucose metabolism in mice fed with a hypercaloric diet.**

(A) Fasting blood glucose levels (B) Glucose tolerance test (GTT) and (C) corresponding area under the curve (AUC) after 15 weeks of diet. (D) Fasting insulinemia before GTT (E) insulinemia measured 15 min after the start of GTT. (F) HOMA-IR was calculated in the different groups. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM, n= 11-18 mice/group, \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

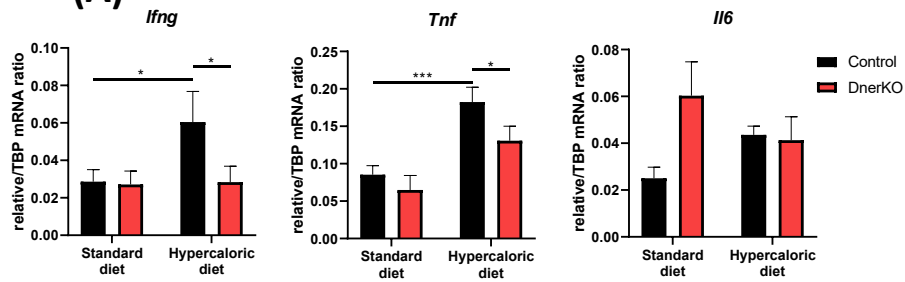
cultures with MNC. Interestingly, we observed a 41% decrease of IL-17A mRNA expression levels, while DNER mRNA expression decreased by 48%, 55% and 70%, respectively in ob-ASC, and co-cultures activated or not with phytohemagglutinin A (PHA) (Figure 6A and 6C). However, the suppressive role of ASC towards PHA-induced TNF $\alpha$  secretion is independent from DNER expression. Taken together, these data suggesting the specific involvement of DNER expressed in ASC on MNC IL-17A production (Figure 6B).

We then investigated whether ob-ASC mediated inflammation could regulate DNER expression. Therefore, we measured DNER expression prior and after the co-culture assay. As shown in figure 6D, we observed that MNC did not express DNER mRNA, whereas obASC expressed it at quite low levels. However, following 24 hours co-culture, a significant increase in Dner mRNA expression levels was observed, whether immune cells were activated or not with PHA, suggesting an inflammation-independent up-regulation of DNER in the co-cultures. To test whether the inflammatory environment mediated by ob-ASC/MNC co-cultures could play in turn a role in DNER regulation, we collected the conditioning medium (CM) from MNC, or co-cultures following 24 hour activation with PHA, or not, and evaluated their effects on fresh ob-ASC. Data shown in figure 6E demonstrated that DNER expression was up-regulated by CM from PHA activated T cells, but was further amplified by CM from ob-ASC-MNC activated co-cultures. Interestingly, interaction of ob-ASC with MNC did not lead to any increase of DNER expression, suggesting thus the role of a secreted factor. Collectively, these data suggest a positive regulation loop between DNER expression and ob-ASC mediated IL-17A production.

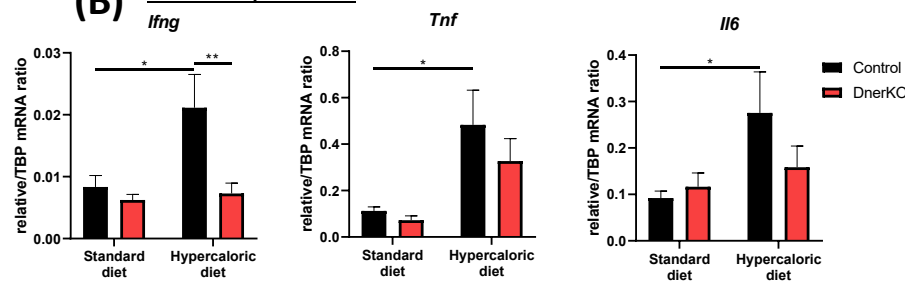
### **The Notch pathway is involved in obASC mediated Th17 cell polarization.**

Because DNER is a NOTCH ligand, we then investigated the role of the NOTCH pathway in ob-ASC mediated Th17 cell polarization. To this end, we used DAPT (ref), an inhibitor of the  $\gamma$ -secretase, , in the human co-culture model or vehicle DMSO, as control. Whereas, as expected , levels of IL-17A secretion increased concomitantly with a decrease of TNF $\alpha$  levels, addition of DAPT, but not DMSO, throughout the 48 hours co-culture assay, resulted in a significant inhibition of IL-17A secretion together with a restoration of TNF $\alpha$  production (Figure 7A), validating thus our hypothesis on the contribution of the NOTCH pathway in ob-ASC mediated Th17 cell polarization. To define the cell lineages in which the NOTCH pathway was activated, we then primed MNC or ob-ASC with DAPT, and washed them, prior to co-culture. As shown in figure 7B, while DAPT demonstrated an inhibition of IL17A mRNA expression, priming ob-ASC with DAPT did not reduce IL-17A mRNA expression levels, as opposed with MNC

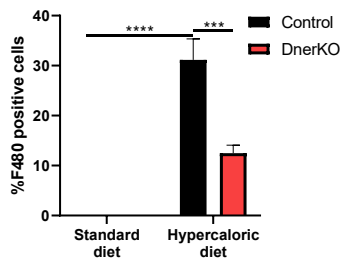
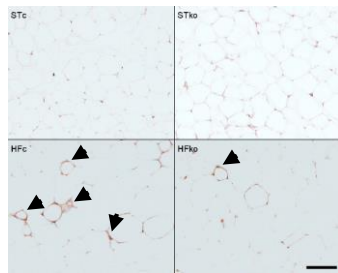
**(A) Subcutaneous adipose tissue**



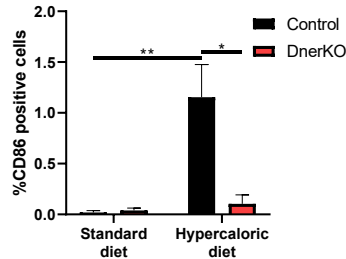
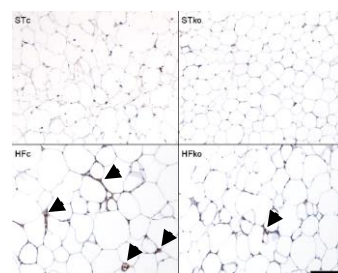
**(B) Visceral adipose tissue**



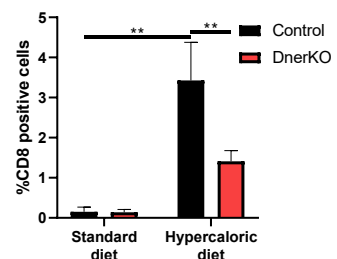
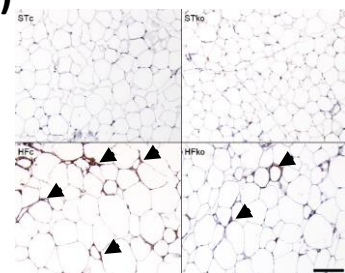
**(C)**



**(D)**



**(E)**



**Figure 5 : DNER is involved in adipose tissue inflammation and immune cell infiltration in mice fed with a hypercaloric diet.** (A) Measurement of inflammatory gene expression in SAT (A) and VAT (B) of wild type and DNERKO mice submitted to hypercaloric or chow diet. Immunohistochemistry staining of F4/80 (C), CD86 (D) and CD8 (E) in VAT. Values are expressed as mean +/- SEM, n= 11-18 mice/group, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001.

priming which resulted in a significant inhibition of IL-17 mRNA expression. Thus, these results suggested that ob-ASC may activate IL17A production in T cells, through activation of the NOTCH pathway. Four isoforms of the NOTCH receptor have been described, but NOTCH 1 has already been reported to be involved in Th17 cell polarization in two models of autoimmune uveitis and in obese asthmatics mice ((Yin et al., 2020; Zeng et al., 2019). Therefore, we used Crenigacestat, a specific inhibitor of the NOTCH1 pathway (Mancarella et al., 2020), in the co-culture assays, and observed a significant and dose-dependent decrease in IL-17A secretion. Moreover, like DAPT, Crenigacestat restored TNF $\alpha$  secretion, although partially, since a significant increase was observed at 10 $\mu$ M (Figure 7C). Taken together, these results strongly suggested the involvement of the NOTCH1 pathway in obASC-mediated Th17 cell activation, and inhibition of Th1 cells.

## Experimental Procedures

### **a) ASC isolation and expansion**

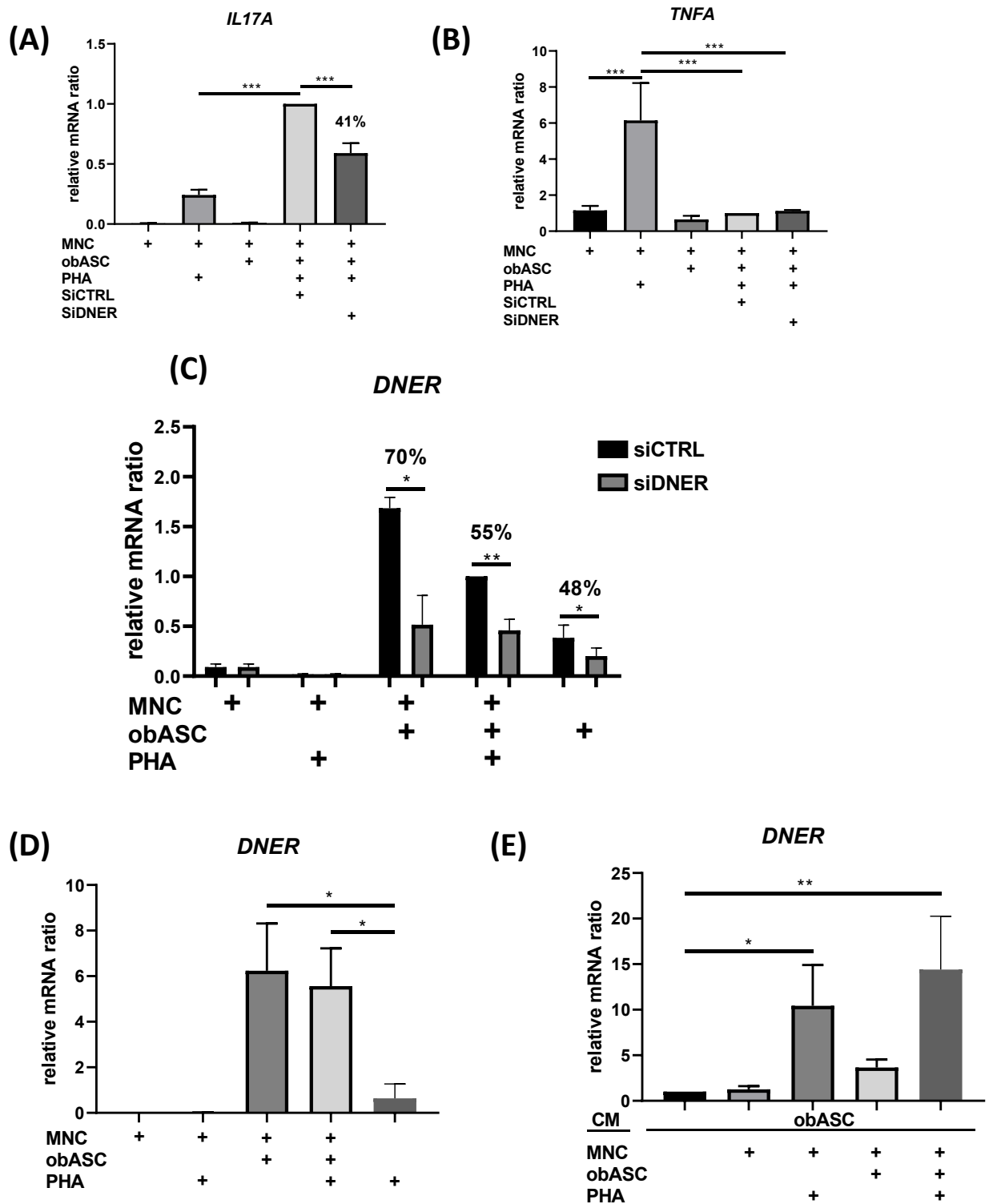
ASC were isolated from residues of bariatric surgery of obese subjects after collagenase digestion. Collagenase action was quenched by the addition of DMEM: F-12 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS). The released stromal vascular fraction was recovered by centrifugation. Residual red blood cells were lysed by hypotonic shock and the ASC component of SVF was selectively expanded in culture medium composed of DMEM: F-12 supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L L-glutamine and 100 U/mL penicillin-streptomycin.

### **b) Mononuclear cells isolation**

Mononuclear cells (MNC) were harvested from healthy human peripheral blood by density gradient centrifugation. MNC were stored in liquid nitrogen prior to use.

### **c) Co-culture assays**

ASC were harvested and seeded for 18-24 h in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin-streptomycin and 2% sodium bicarbonate. MNC were co-seeded for 48 h in the presence or absence of phytohaemagglutinin (PHA) to activate T lymphocytes. Supernatant was harvested after 48 h, and frozen. To inhibit Notch



**Figure 6 : DNER contributes to ob-ASC-mediated Th17 cell polarization in a human co-culture model.** (A) IL-17A, (B) TNF $\alpha$  and (C) DNER expression in co-culture of obASC transfected by a siRNA targeting DNER and MNC activated by PHA. (D) DNER expression in co-culture of obASC and MNC activated by PHA. (E) DNER expression in obASC submitted to inflammatory conditioned medium from our co-culture of obASC and MNC activated by PHA. Values are expressed as mean +/- SEM, n= 3 experiments, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001

pathway, DAPT (a gamma secretase inhibitor: GSI) was added to culture. An another GSI specific to Notch 1 was also used, Crenigacestat. Cells were also previously incubated with siDNER to evaluate the effect of DNER inhibition.

#### **d) RT-qPCR.**

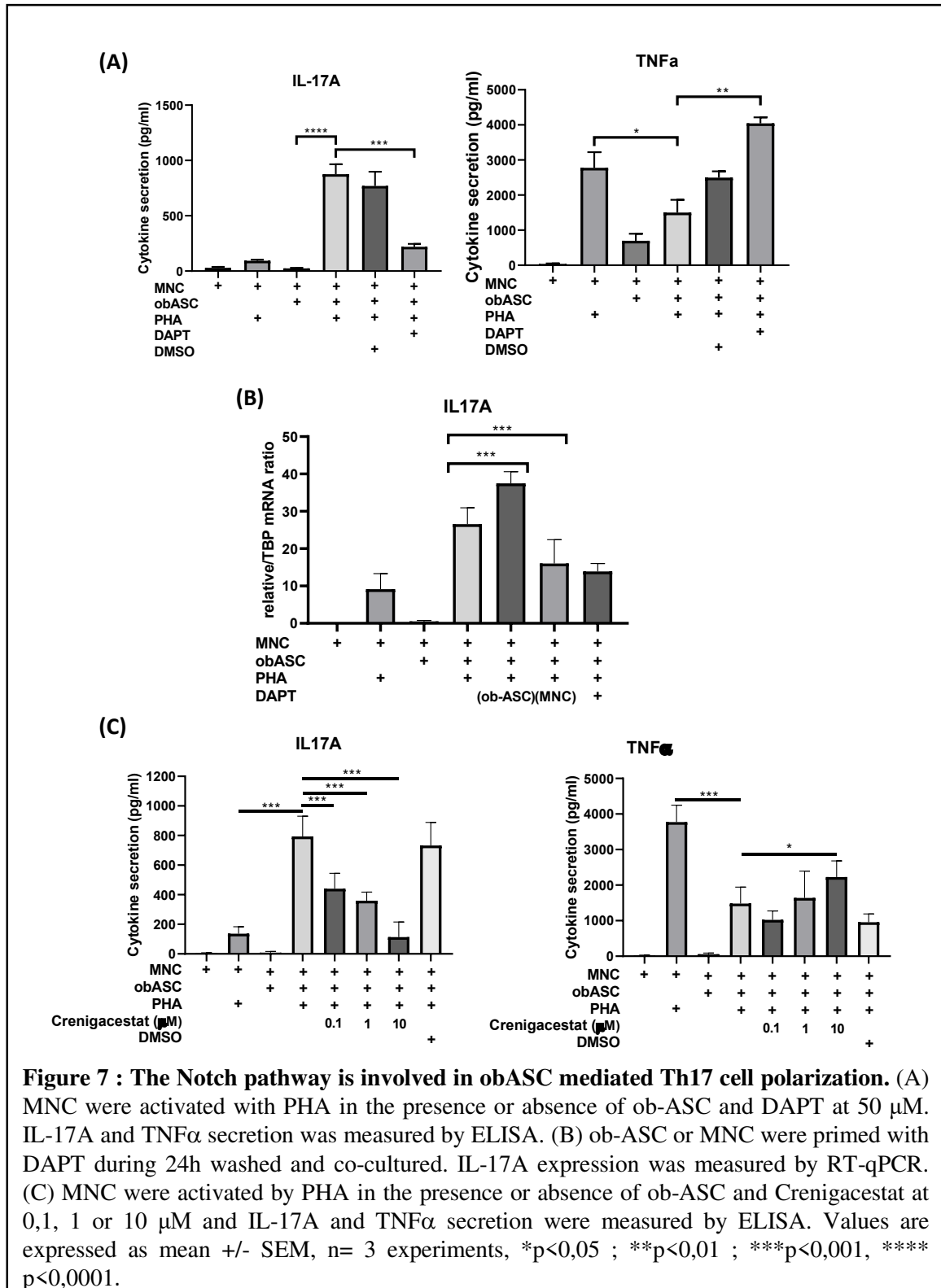
Total RNA was extracted from co-cultures using the Tri Isolation Reagent<sup>TM</sup>. RNAs were stored at -80°C. cDNA was synthesized from 250 ng of total RNA using the Primescript<sup>TM</sup> RT reverse transcription kit (Takara, Dalian, Japan) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed in duplicate on a Rotor-gene Real-time PCR System, using the Absolute <sup>TM</sup> qPCR SYBR Green Mix (ABgene, Illkirch, France). Quantitative data were defined by threshold cycle (Ct) normalized for the housekeeping gene TATA Box Binding Protein (TBP).

#### **e) Cytokine secretion measurement.**

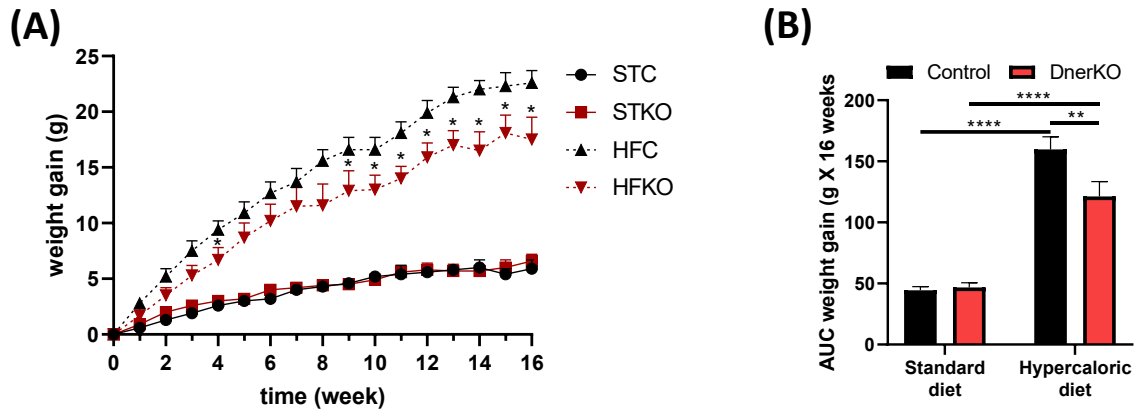
IL-17A secretion was measured by sandwich ELISA, using the corresponding antibodies.

#### **f) Mice.**

Wild type (WT) and DNER knockout mice (DNERKO) were fed with a hypercaloric or chow diet for 16 weeks. Weight and glycaemia were monitored, and AT were harvested to measure pro-inflammatory cytokines expression by RT-qPCR.



## Supplementary figure 1



**Supplementary figure 1 :** (A) Body weight gain and (B) corresponding area under the curve. Values are expressed as mean +/- SEM, n= 11-18 mice/group, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001.



## **Discussion et perspectives**

Dans l'obésité peu d'études se sont intéressées au rôle de DNER. Néanmoins, deux études suggèrent le rôle de DNER comme biomarqueur dans les polyneuropathies motrices associées à l'obésité générale et abdominale (Herder et al., 2018; Schlesinger et al., 2019) et une autre étude a observé que l'expression de DNER mesurée dans le liquide cébrospinal, de patients subissant des interventions chirurgicales de routine, est corrélée à l'IMC (Larsson et al., 2015). Ces différentes études suggèrent donc un possible rôle de DNER dans l'obésité. De plus, dans un autre modèle de pathologie inflammatoire chronique tel que la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), DNER semble également impliqué dans les mécanismes conduisant à l'inflammation du tissu épithélial pulmonaire, via l'activation de la voie Notch et la production d'IFN $\gamma$ . En effet, dans cette pathologie une augmentation de l'expression de DNER au sein des poumons des patients atteints de BPCO a été observée en comparaison à des poumons de patients sains ainsi que dans les poumons de souris soumises pendant 6 mois à de la fumée de cigarette (Ballester-López et al., 2019).

Afin de valider le rôle de DNER dans l'obésité et notamment dans l'inflammation du tissu adipeux, nous avons développé un modèle murin de souris KO pour DNER et les avons soumises pendant 16 semaines à un régime normocalorique ou hypercalorique et les avons comparées à des souris sauvages soumises à ces deux mêmes régimes. En ce qui concerne le métabolisme glucidique, nous avons montré que la délétion de DNER chez les souris soumises à un régime hypercalorique (HFKO) réduit leur glycémie et améliore leur réponse au glucose lors d'un GTT en comparaison aux souris sauvages soumises au même régime (HFC) (Figure 2). Pour rappel, DNER est un ligand de la voie Notch. Confortant nos résultats, il a été montré que l'utilisation d'un inhibiteur de l'activation de la voie Notch (GSI) chez des souris rendues obèses par surnutrition, améliore leur tolérance au glucose et diminue leur glycémie, c'est également le cas chez des souris *ob/ob* (Pajvani et al., 2011). Par ailleurs, nous avons également montré que les souris HFKO présentent une diminution de l'insulinémie à jeun par rapport aux souris HFC (Figure 4).

En plus des effets du KO de DNER sur le métabolisme glucidique, nous avons également observé que les souris HFKO présentent une diminution significative du gain de poids par rapport aux souris HFC. Cette diminution du gain de poids était associée à une diminution de la masse du TAsc et du TAvs et également de la masse du foie (Figure 2). En accord avec nos résultats, une étude utilisant des souris déficientes pour Notch 1 et rendues

obèses par surnutrition, a également montré une diminution du poids du TA. De plus, dans la même étude les auteurs ont montré que des souris génétiquement obèses (*ob/ob*) traitées par un GSI présentent une diminution de la masse totale, de la masse de leur TAsc et de leur TAvis ainsi qu'une diminution de la masse hépatique, corrélée à une diminution de l'accumulation de lipides dans le foie impliquant donc Notch 1 dans l'obésité (Bi et al., 2014). De façon intéressante, dans notre modèle de souris HFKO nous avons également retrouvé une diminution des triglycérides hépatiques par rapport aux souris HFC. Nous avons également mis en évidence une diminution significative du cholestérol plasmatique libre et estérifié chez ces souris (Figure 5). Or, chez des patientes en obésité sévère ou atteinte de stéatose hépatique non alcoolique, il a été mis en évidence une corrélation entre l'expression de HES5 (un gène cible de Notch) avec le « sterol regulatory element-binding protein 1c » (SREBP1c), une protéine impliquée dans la lipogénèse. De plus, chez ces mêmes patientes une corrélation positive entre l'expression de Notch 3 et celle de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme lipidique hépatique a été observée, notamment SREBP1c, la « fatty acid synthase » ou encore l'acetyl CoA carboxylase 1 (Auguet et al., 2020). Tous ces résultats démontrent un rôle de Notch 1 ou 3 dans l'augmentation de la masse de tissu adipeux d'une part, et le métabolisme lipidique au niveau hépatique d'autre part. Notre modèle de souris HFKO pour DNER, nous permet donc de suggérer que le ligand DNER pourrait être impliqué dans l'activation de la voie Notch observée chez les souris obèses, et induisant une accumulation de lipides au niveau du TA et du foie.

Du fait du rôle probable de DNER dans l'inflammation du TA, nous avons par la suite mesuré l'expression des cytokines pro-inflammatoires présentes dans les TAsc et TAvis des souris sauvages ou DNERKO. Nous avons également évalué l'infiltration macrophagique et lymphocytaire au sein de ces mêmes tissus. Nous avons pu montrer une diminution d'expression de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  dans le TAsc des souris HFKO par rapport aux souris HFC. Dans le TAvis nous avons également observé une diminution de l'IFN $\gamma$  mais seulement une tendance à la diminution de l'expression du TNF $\alpha$  et de l'IL-6 chez les souris HFKO, probablement lié au fait que les niveaux d'expression de TNF $\alpha$  et d'IL-6 sont nettement plus élevés dans le TAvis que dans le TAsc donc plus difficiles à inhiber (Figure 5). L'augmentation de taille des adipocytes lors de l'obésité est connue pour induire une hypoxie entraînant au sein du TA une infiltration de lymphocytes T cytotoxiques dont le but est de lyser les adipocytes hypertrophiques. Une infiltration de macrophages de type 1 est alors déclenchée par les lymphocytes cytotoxiques pour phagocyter les cellules apoptotiques (Nishimura et al., 2009). Nous avons donc voulu évaluer ces deux paramètres au sein de notre modèle de souris

DNERKO surnourries. Pour ce faire, nous avons mesuré par immunohistochimie le marquage de F4/80 (macrophages), CD86 (macrophages M1, DC activées) et CD8 (lymphocytes T cytotoxiques) au sein du TAVis. Nous avons observé une augmentation de ces trois marqueurs, localisée autour des adipocytes (structures en couronne) chez les souris HFC par rapport aux souris sauvages nourries avec un régime standard (STC). De façon intéressante, l'expression de ces trois marqueurs a été fortement diminuée dans le TAVis chez les souris HFKO pour DNER par rapport aux souris HFC (Figure 5), validant donc qu'une forte diminution de l'infiltration macrophagique et de l'infiltration lymphocytaire de type cytotoxique a lieu au sein du TAVis de ces souris.

Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans le modèle de la BPCO précédemment mentionné. En effet, dans ce modèle les auteurs ont utilisé des souris déficientes pour DNER et soumises à de la fumée de cigarette pendant 6 mois, pour mimer la BPCO humaine, et ont montré au sein des poumons de ces souris, une diminution du recrutement des macrophages M1 pro-inflammatoires en comparaison aux souris sauvages. De plus, une diminution de l'expression d'IFN $\gamma$  a également été décrite dans ce modèle (Ballester-López et al., 2019). Par ailleurs, confortant nos résultats, il a été observé une diminution d'expression du marqueur CD68 (monocytes/macrophages) au sein du TAVis des souris *ob/ob* suite à un traitement par un GSI (Bi et al., 2014).

Comme DNER semble impliqué dans la stéatose hépatique au vu de nos résultats et au vu des articles déjà mentionnés il pourrait être intéressant d'évaluer le degré d'infiltration lymphocytaire et macrophagique au sein du foie des souris DNERKO versus sauvage. En effet, la stéatose hépatique est associée à une augmentation de la présence de macrophages dans le foie et de marqueurs de l'inflammation et une étude a montré que l'activation de la voie Notch dans le foie induit l'expression de marqueurs de macrophages de type M1 (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , iNOS) (Xu et al., 2015). De plus, l'inhibition de la voie Notch par un GSI spécifique au niveau hépatique a permis d'induire une diminution de l'inflammation notamment via la diminution d'expression de MCP-1 et de CD45 (marqueurs des cellules hématopoïétiques) et une diminution de la présence de macrophages (Richter et al., 2020). Nous pouvons supposer que dans les souris HFKO, l'inflammation hépatique est diminuée. Conjointement aux résultats de la littérature nos résultats suggèrent que via son interaction avec Notch, DNER serait en partie responsable de l'inflammation observée au sein du tissu adipeux de souris obèses, et potentiellement dans le foie.

Afin de mieux comprendre les mécanismes induisant l'inflammation du TA chez le sujet obèse, nous avons utilisé un modèle de co-culture humain contenant des cellules souches adipocytaires d'origine mésenchymateuse (CSA) de sujets en état d'obésité et des cellules mononuclées du sang (CMN) co-activées par la PHA. Dans ce modèle, la présence de CSAob induit la sécrétion d'IL-17A par les lymphocytes Th17 et inhibe la sécrétion de cytokines par les lymphocytes Th1 (IL-2, TNF $\alpha$ ). Par ailleurs, nous avons montré que l'interaction entre CSA et CMN est nécessaire à la polarisation des Th17 à l'aide de filtres intercellulaires. Cependant, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre ICAM-1, n'a inhibé qu'en partie cette même sécrétion et de ce fait, nous a permis de suggérer que cette interaction pourrait être liée à un autre mécanisme moléculaire. Nous avons pensé à la voie Notch puisqu'elle nécessite un contact intercellulaire pour être activée et son activation est cruciale pour la différenciation et la polarisation des lymphocytes T. De plus, en faveur de cette hypothèse, le Dr Eljaafari avait montré l'importance de la voie Notch dans les interactions CSM et cellules immunes de type dendritiques, pour l'induction de la tolérance lymphocytaire. Pour valider son implication dans notre modèle, nous avons utilisé un inhibiteur de cette voie (un GSI), lors des co-cultures. Nous avons pu montrer que l'inhibition de la voie Notch entraîne une réactivation de la voie Th1, tel que démontré par une augmentation de la sécrétion du TNF $\alpha$  et une inhibition de la sécrétion d'IL-17A, suggérant donc le rôle de Notch dans la polarisation des CMN vers la voie Th17 médiée par les CSA (Figure 7).

Comme les CSA expriment également des récepteurs de Notch, pour savoir si l'activation de la voie Notch a lieu au sein des CMN ou au sein des CSA, nous avons préincubé les CSA ou les CMN en présence du GSI pendant 24 heures. Puis nous les avons lavées et co-cultivées en présence de PHA et nous avons montré que seule la préincubation des CMN inhibe l'expression d'IL-17A dans notre modèle. Ceci nous a donc permis de confirmer que la voie Notch est activée dans ce modèle de co-culture et qu'elle est nécessaire à la polarisation des CMN vers la voie Th17. Enfin, comme Notch 1 et Notch 2 sont connus tous les deux pour être impliqués dans la différenciation des lymphocytes T, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de Notch 1, le Crenigacestat. En effet, le Crenigacestat (le second GSI utilisée dans cette étude) a été décrit comme inhibant spécifiquement le clivage de Notch 1 mais pas celui de Notch 2,3 ou 4 et ce, dans plusieurs lignées cellulaires (Mancarella et al., 2020). Nous avons pu montrer que la présence de ce dernier inhibe de façon dose dépendante la production d'IL-17A et restaure la sécrétion de TNF $\alpha$  (Figure 7). En accord, plusieurs études ont montré *in vitro* et *in vivo* que la voie Notch est impliquée dans la polarisation des Th17. Par exemple l'utilisation de

GSI ou de siRNA dirigés spécifiquement contre Notch 1 a permis d'inhiber la sécrétion d'IL-17 et la polarisation des lymphocytes T en Th17 *in vitro* de lymphocytes humains et murins (Keerthivasan et al., 2011). La même étude a montré que le NICD est capable de se fixer directement sur les promoteurs de l'IL-17 et de RORC. De plus, *in vivo* dans un modèle murin de psoriasis, l'utilisation du GSI a permis de diminuer le pourcentage de Th17 pathogéniques au niveau des lésions cutanées, ainsi que la concentration d'IL-17A sérique chez les souris traitées (Y. Wang et al., 2020). Enfin, dans un modèle de souris asthmatiques obèses, l'inhibition de la voie Notch a conduit à une diminution de la polarisation des lymphocytes Th17 et la sécrétion d'IL-17A au niveau sérique (Zeng et al., 2019).

Parmi les ligands de la voie Notch, le ligand non canonique DNER a été impliqué dans la susceptibilité au DT2, dans la modulation de l'adipogenèse et dans la différenciation des progéniteurs  $\beta$  pancréatiques, ce qui nous a amené à suggérer son rôle dans notre modèle. Nous avons alors collecté le milieu conditionné (MC) issu de nos co-cultures activées par la PHA et cultivé des CSAob en présence de ce MC. Nous avons pu montrer une surexpression de DNER par les CSAob, suggérant le rôle de l'inflammation médiée par l'interaction CSA et CMN dans la surexpression de DNER (Figure 6). En accord avec ces résultats, une étude a montré que la stimulation de CSA par du TNF $\alpha$  induit l'expression de DNER (Ting et al., 2021). Puisque nous avons montré que Notch est impliqué dans la sécrétion d'IL-17A médiée par les CSA à l'aide du GSI, nous avons voulu étudier le rôle de DNER dans cette fonction. Pour ce faire nous avons utilisé un siRNA ciblant l'ARNm de DNER, et l'avons transfecté dans les CSA avant de co-cultiver ces CSA avec des CMN activées par la PHA. Nous avons alors pu montrer que la production d'IL-17A est inhibée en présence du siRNA de DNER. Par contre, cette inhibition semble spécifique à l'expression de l'IL-17A puisque ni le TNF $\alpha$  ni l'IFN $\gamma$  n'ont montré de variation d'expression en présence du siRNA (Figure 7). De façon intéressante une autre étude a mis en avant le rôle d'un autre ligand du récepteur Notch, Dll4, dans la polarisation des lymphocytes Th17. Ici, nous montrons que DNER peut également jouer un rôle dans cette polarisation (Mukherjee et al., 2009). Pour savoir si Dll4 est impliqué dans notre modèle, nous avons donc inhibé son expression à l'aide de siRNA au niveau des CSA et avons montré que cette inhibition n'avait pas d'impact sur l'expression d'IL-17A (non-présenté dans la partie résultats) suggérant donc que Dll4 n'est pas impliqué dans la polarisation des lymphocytes Th17 par les CSA issues de sujets obèses.

Ainsi dans cette étude nous avons pu mettre en évidence le rôle de la voie de signalisation Notch et de son ligand non canonique, DNER, dans l'inflammation du tissu

adipeux des sujets obèses et dans le syndrome métabolique. La modulation de cette voie pourrait permettre de trouver de nouvelles pistes de traitement dans l'inflammation chronique de bas grade associée à l'obésité.

## **I- Perspectives à court-terme**

Pour finaliser cette étude plusieurs expérimentations sont envisageables. Nous aimerions en premier lieu confirmer que l'isoforme Notch 1 est impliquée dans le modèle de co-culture, et confirmer l'interaction physique entre DNER et Notch 1. Pour ce faire des expériences d'immunofluorescence sont envisageables afin d'observer ou non la colocalisation entre DNER et Notch 1. Cette interaction pourrait également être visualisée à l'aide d'une co-immunoprécipitation de DNER, pour identifier sa liaison avec Notch 1.

Ensuite, toujours dans ce modèle de co-culture, il serait intéressant de comprendre les mécanismes d'activation de la voie de signalisation de Notch. En effet, cette dernière peut être activée de manière canonique via la translocation du NICD dans le noyau ou non canonique en interagissant avec d'autres voies de signalisation ou d'autres protéines. En premier lieu, mesurer l'expression de Deltex connue pour participer à la signalisation non canonique de Notch paraît nécessaire. Cela donnerait un indice de son implication. Ensuite, nous avons montré l'implication de la voie PI3K et de STAT3 dans la polarisation des lymphocytes Th17 (Eljaafari et al., 2015a), puisque leur inhibition respective a diminué la sécrétion d'IL-17A. Or, la voie non canonique de Notch est capable d'activer de façon indirecte la voie PI3K. Hes1 (une cible de Notch) induit l'inhibition de PTEN, qui est lui-même un inhibiteur de la voie PI3K (Bailis and Pear, 2012; Ni et al., 2021). Il serait donc très intéressant d'évaluer l'activation de la PI3K en présence de GSI dans ce modèle de co-culture.

Comme notre équipe a précédemment montré que ces adipocytes tout comme les CSA issues de sujets en état d'obésité, sont capables d'induire la polarisation des lymphocytes Th17 (Chehimi et al., 2016) et qu'ils sont connus pour exprimer DNER (Park et al., 2010a), il serait intéressant d'analyser si la modulation de DNER au sein des adipocytes par des siRNA, pourrait inhiber la polarisation des lymphocytes Th17 médié par les adipocytes, ce qui permettrait de démontrer le rôle de DNER dans l'inflammation médiée par les adipocytes. Ainsi les adipocytes issus des CSA pourraient avoir un rôle dans l'inflammation du tissu adipeux et les anomalies métaboliques. L'adipsine est une adipokine sécrétée par les adipocytes et ayant

un rôle protecteur vis-à-vis des cellules  $\beta$ -pancréatiques puisqu'une étude a montré que les îlots pancréatiques provenant de souris déficientes en adiposine, présentent une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Lo et al., 2014). Or, une diminution de l'insuline plasmatique, ainsi qu'une baisse de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose a été observée dans les souris DNERKO avec une baisse du nombre d'îlots  $\beta$ , suggérant que la production d'adiposine par les adipocytes puisse dépendre de DNER et jouer un rôle dans la production d'insuline pancréatique. Cette hypothèse serait vraiment intéressante à vérifier.

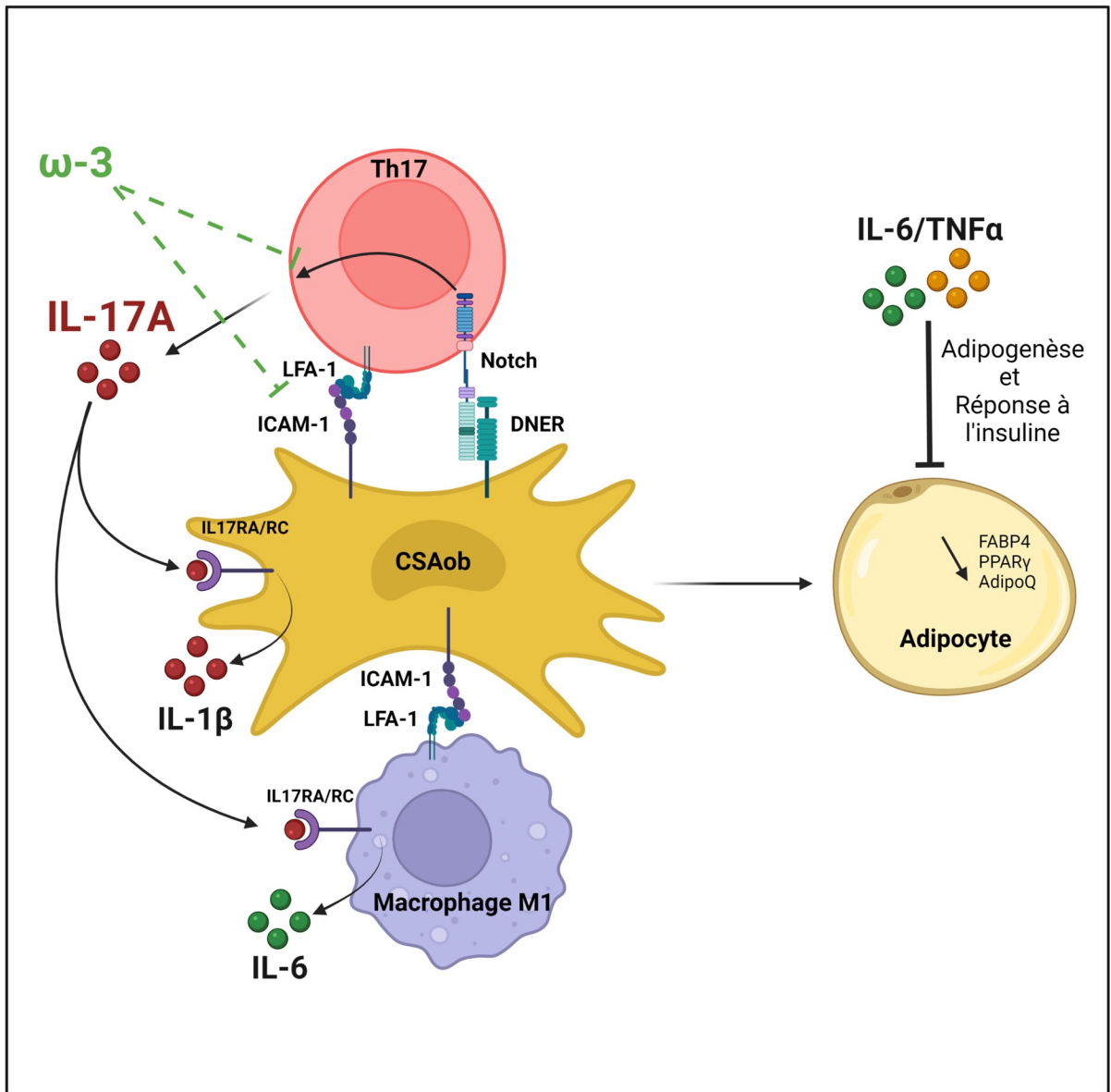
## **II-Perspectives à long terme**

### Ciblage de la voie Notch et de DNER

La mise en cause de la voie Notch et de DNER dans l'inflammation du tissu adipeux chez le sujet en situation d'obésité nous laisse espérer la découverte de nouveaux traitements. La méthode la plus simple pour inhiber la voie de signalisation Notch serait d'utiliser un GSI soit de manière préventive, soit de manière curative notamment chez les obèses métaboliquement atteints. Il en existe une centaine actuellement. Les GSI sont principalement utilisés dans des études cliniques et précliniques pour traiter des cancers, telles que le cancer colorectal, ou certains carcinomes. Chez l'Homme, l'inhibition de la voie Notch par un GSI induit une diminution de la progression tumorale. Néanmoins, du fait du rôle de Notch dans l'homéostasie des cellules intestinales, le traitement par le GSI donne beaucoup d'effets secondaires notamment intestinaux (Collins et al., 2021). Les effets secondaires les plus courants sont diarrhée, nausées, fatigue, rash voire même anémie (Venkatesh et al., 2018). Aussi, certaines études cliniques voulant traiter des tumeurs solides métastatiques ont dû stopper le traitement du fait d'effets secondaires trop importants (Azaro et al., 2021). Les GSI ont de nombreux effets secondaires du fait de leur non spécificité. Afin de limiter les effets secondaires provoqués par les GSI, des systèmes d'administration ciblée sont en développement. Par exemple, des nanoparticules ciblant le foie dans lesquelles sont encapsulées le GSI ont été utilisées chez des souris présentant une stéatose hépatique non alcoolique. Dans ce modèle, aucun effet secondaire intestinal n'a été observé, rendant ce type de voie d'administration prometteuse (Richter et al., 2020). Une autre solution serait l'utilisation d'anticorps directement dirigés contre le récepteur Notch ou contre un de ses ligands. Certains anticorps spécifiquement dirigés contre Notch 1 ou Notch 2/3 ou encore certains anticorps

ciblant Dll4 ont été développés et sont utilisés dans des essais cliniques contre le cancer (Meurette and Mehlen, 2018). Néanmoins, des effets secondaires similaires à ceux décrits pour les GSI, ont été observés suite à l'administration de ces anticorps. Ceci pourrait être lié au rôle de Notch dans de nombreux organes. Comme nous avons impliqué DNER, un ligand non canonique de Notch qui semble agir spécifiquement dans le tissu adipeux, l'utilisation d'anticorps bloquant DNER pourrait être envisagé contre l'inflammation du tissu adipeux des sujets en situation d'obésité. Il faudrait en premier lieu évaluer la toxicité de l'utilisation d'un tel anticorps. En effet, des auto-anticorps dirigés contre DNER ont été retrouvés chez des patients atteints d'ataxie cérébelleuse (de Graaff et al., 2012; Shen et al., 2021), cela pourrait être un frein à l'utilisation de tels anticorps chez des patients obèses. Par contre l'utilisation de peptides bloquants DNER pourrait avoir un intérêt surtout si l'on peut cibler le tissu adipeux.

D'autres molécules ont été décrites comme capables d'inhiber la voie de signalisation Notch notamment dans le cas du cancer colorectal. Les molécules les plus intéressantes sont celles ne déclenchant pas ou peu d'effets secondaires. Certaines bactéries probiotiques semblent capables d'inhiber la voie de signalisation Notch. Par exemple les bactéries *Lactobacillus acidophilus* et *Bacillus subtilis* ont permis dans un modèle murin de colite, d'inhiber l'expression de Dll1, Dll4, ou encore HES1. Néanmoins, l'effet de ces bactéries est certainement local, au niveau de l'intestin. L'utilisation de ces probiotiques pour inhiber la voie de signalisation Notch dans le tissu adipeux serait certainement difficile à mettre en place (Y. Li et al., 2020; Haiqin Wu et al., 2018). D'autres molécules présentes dans les plantes, sont également capables d'inhiber la voie Notch. La cucurbitacine en fait partie. Elle est présente chez certaines plantes notamment les cucurbitacées (courges et gourdes). La cucurbitacine est capable de se fixer aux répétitions ankyrines présentes au niveau du NICD du récepteur Notch, inhibant son activation. De plus, la cucurbitacine réduit l'expression des 4 isoformes du récepteur Notch, plusieurs ligands canoniques de Notch ainsi que celle des composants de la  $\gamma$ -sécrétase (Dandawate et al., 2020). La quercétine, un polyphénol, est également capable d'inhiber l'expression de Notch-1 ainsi que celle du complexe  $\gamma$ -sécrétase par des cellules cancéreuses colorectales. (Pu et al., 2021). La consommation d'extrait de *Ziziphus spina-christi* enrichi avec du thé vert a démontré une amélioration du métabolisme dans un modèle de stéatose hépatique non alcoolique de rat. En effet, cette combinaison de molécules a diminué le poids corporel, amélioré le profil lipidique et la sensibilité à l'insuline de ces rats. Cette combinaison a également inhibé le niveau circulant de TNF- $\alpha$  et augmenté celui d'adiponectine chez ces rats. L'effet protecteur de l'extrait *Ziziphus* combiné au thé vert, contre la NAFLD,



**Figure 31 : Schéma de conclusion.** Les CSAob induisent l'activation des lymphocytes Th17 et des monocytes/macrophages. Nous avons mis en évidence l'implication d'ICAM-1/LFA-1 ainsi que celle du récepteur Notch et de son ligand DNER dans cette activation. L'activation de la voie Notch au niveau des lymphocytes induit leur polarisation en Th17 et la sécrétion d'IL-17A. L'IL-17A est capable de propager l'inflammation en induisant l'expression d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  par les CSAob et les macrophages, respectivement. De plus, l'environnement inflammatoire contenant notamment de l'IL-6 inhibe l'adipogenèse et la réponse à l'insuline des adipocytes. Enfin, les omega-3 sont capables d'inhiber spécifiquement la sécrétion d'IL-17A via un mécanisme impliquant ICAM-1.

passer par l'inhibition de l'activité hépatique de la caspase-3 et l'inhibition de l'expression de Notch 1 et de Hes1.

Ensuite nous avons montré dans l'article numéro 2, que les  $\omega$ -3 (ALA, EPA, DHA) sont capables d'inhiber la polarisation des lymphocytes Th17 médiée par les CSAob (**Figure 31**). Nous avons démontré que pour ce faire, les  $\omega$ -3 induisent une diminution de l'expression d'ICAM-1. LFA-1 est le ligand d'ICAM-1, il joue un rôle important dans les interactions intercellulaires (Rothlein et al., 1986) et est exprimé par les leucocytes. Nos résultats suggèrent que l'inhibition d'ICAM-1 au niveau des CSA et des monocytes pourrait réduire la capacité des monocytes et des macrophages à interagir avec les lymphocytes T. D'ailleurs, l'activation de CMN par la PHA en présence d'ALA a fortement réduit la formation d'agrégats cellulaires. Nous avons montré dans le dernier article que la voie de signalisation Notch et son ligand DNER sont impliqués eux aussi dans la polarisation des lymphocytes Th17 médiée par les CSAob. Il pourrait être très intéressant d'évaluer le niveau d'activation de la voie de signalisation Notch et l'expression de DNER dans notre modèle de co-culture en présence d' $\omega$ -3. En effet, la DHA a été décrite comme étant également capable d'inhiber l'expression protéique de Notch 1 et de Jagged 1 dans les macrophages pulmonaires (Ali et al., 2016). Cela pourrait contribuer à expliquer l'effet inhibiteur des  $\omega$ -3 dans notre modèle de co-culture.

Ces derniers composants proviennent soit de plantes, soit sont retrouvés dans certains aliments mais dans tous les cas, l'effet sur DNER n'a jamais été étudié, ni même l'effet sur l'inflammation du tissu adipeux.

### Ciblage de l'IL-17A

Dans l'article numéro 1 nous avons mis en évidence le rôle de l'IL-17A dans la propagation de l'inflammation (**Figure 31**). En effet, la fixation de l'IL-17A sur son récepteur induit au niveau des cellules cibles l'expression de cytokines inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-6 ou l'IL-1 $\beta$  mais également des chimiokines (CXCL8, CXCL1, CXCL10) et des métalloprotéinases matricielles. D'ailleurs, dans notre étude, l'utilisation d'anticorps bloquant l'IL-17A (Sécukinumab) a induit une diminution d'expression d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  par les adipocytes soumis à un milieu conditionné pro-inflammatoire. Comme nous l'avons vu dans les chapitres II et III, ces différentes cytokines sont impliquées dans l'inflammation du tissu

adipeux au cours de l'obésité et dans les dysfonctions métaboliques qui en résultent. L'utilisation du Sécukinumab chez des personnes atteintes d'obésité pourrait donc être un traitement envisageable afin de moduler l'expression de ces cytokines inflammatoires et peut-être de réduire la résistance à l'insuline retrouvée chez ces patients. Le Sécukinumab est d'ailleurs déjà utilisé dans le traitement d'autres pathologies inflammatoires chroniques impliquant les lymphocytes Th17, le psoriasis ou encore la spondylarthrites ankylosantes (Aparicio et al., 2021; Blair, 2021).

#### Impact de la voie de signalisation Notch sur les pathologies inflammatoires associées à l'obésité

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, l'obésité est associée à un grand nombre de comorbidités, notamment des pathologies inflammatoires chroniques. Les lymphocytes Th17 et l'IL-17A sont impliqués dans un certain nombre de ces pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou encore le cancer (Chehimi et al., 2017). Nous avons montré dans cette étude que la voie de signalisation Notch est impliquée dans la polarisation des lymphocytes Th17 (**Figure 31**). D'ailleurs d'autres auteurs ont confirmé ce résultat (Yin et al., 2020; Zeng et al., 2019). Il pourrait être intéressant d'évaluer l'implication de la voie Notch dans ces différentes pathologies. D'ailleurs, la mise en cause de la voie Notch dans un modèle murin de psoriasis a déjà été démontré (Y. Wang et al., 2020). En effet, les auteurs ont traité des souris, ayant des lésions semblables à celles du psoriasis, avec un GSI. Ils ont alors montré une atténuation des lésions cutanées chez les souris traitées. Cette amélioration est associée à une diminution de l'infiltration des lésions par les lymphocytes T sécrétant de l'IL-17A. En prenant en compte ces résultats, il pourrait être intéressant d'évaluer l'expression du ligand DNER au niveau de lésions cutanées dans ce modèle mais également dans d'autres modèles d'inflammation chronique impliquant l'IL-17A.

L'obésité est également associée au développement de certains cancers. Dans le cas du cancer du sein, la proximité du tissu adipeux et des cellules épithéliales mammaires favorise la progression tumorale, notamment chez les patientes en état d'obésité (Kothari et al., 2020). De fait, au cours de l'obésité le tissu adipeux sécrète de nombreuses adipokines qui peuvent influencer le développement tumoral en participant notamment à l'angiogenèse tumorale (Leptine, IL-6, VEGF) (Bougaret et al., 2017). De plus, l'IL-17A au niveau intra-tumoral a été retrouvé augmenté dans de nombreux cancers, notamment les cancers mammaires (Fabre et al., 2018). Il pourrait alors être envisageable d'évaluer l'impact de l'activation des Th17 médiée par les CSAob sur la progression tumorale mammaire. Pour ce faire, nous pourrions incuber

des cellules tumorales mammaires (MDA-MB-231, MCF-7) en présence des milieux conditionnés inflammatoires provenant de nos co-cultures CMN/CSA de sujets en état d'obésité. Il serait intéressant de mesurer l'expression de gènes inflammatoires (IL-6), de gènes impliqués dans l'angiogenèse (VEGF) ou encore dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MMP9). De plus, en utilisant un GSI dans nos co-cultures, nous avons mis en évidence une diminution de la sécrétion d'IL-17A. Ainsi l'incubation de cellules tumorales en présence de milieux conditionnés inflammatoires provenant d'une co-culture traitée au GSI, nous permettrait de mettre évidence l'implication de la voie Notch dans la progression tumorale médiée par les CSAob.

Par ailleurs, le ligand DNER et la voie Notch sont impliqués dans la progression de plusieurs cancers (cancers prostatiques, carcinome hépatocellulaire, ou encore cancer du sein) (Wang et al., 2017), (Y. Liang et al., 2018) (L. Wang et al., 2019). D'ailleurs, DNER est surexprimé par les cellules cancéreuses de tumeurs mammaires. Il a été démontré qu'il régule la transition épithelio-mésenchymateuse et protège de l'apoptose les cellules de cancer du sein via l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -catenin. Une expression élevée de DNER et de  $\beta$ -catenin est associée à une plus faible survie (Z. Wang et al., 2020). Nous pourrions alors supposer que les cellules tumorales elles même pourraient, via l'expression de DNER, activer la voie Notch dans les lymphocytes et induire leur polarisation en Th17. Afin de vérifier cette hypothèse, une co-culture entre CMN activées par la PHA et cellules tumorales exprimant DNER pourrait être réalisée.



# **Bibliographie**

- Abdel-Moneim, A., Bakery, H.H., Allam, G., 2018. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* 101, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.103>
- Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L.A.B., Koenders, M.I., Devesa, I., Roelofs, M.F., Radstake, T.R.D.J., Heuvelmans-Jacobs, M., Akira, S., Nicklin, M.J.H., Ribeiro-Dias, F., van den Berg, W.B., 2008. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest* 118, 205–216. <https://doi.org/10.1172/JCI32639>
- Abedi, E., Sahari, M.A., 2014. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Sci Nutr* 2, 443–463. <https://doi.org/10.1002/fsn3.121>
- Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., Grimaldi, P.A., 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 268, 17665–17668.
- AbuMweis, S., Jew, S., Tayyem, R., Agraib, L., 2018. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid containing supplements modulate risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis of randomised placebo-control human clinical trials. *J Hum Nutr Diet* 31, 67–84. <https://doi.org/10.1111/jhn.12493>
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., Honjo, T., 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8, 765–772. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.765>
- Agbaga, M.-P., Mandal, M.N.A., Anderson, R.E., 2010. Retinal very long-chain PUFAs: new insights from studies on ELOVL4 protein. *J Lipid Res* 51, 1624–1642. <https://doi.org/10.1194/jlr.R005025>
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F.J., Gurney, A.L., 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278, 1910–1914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207577200>
- Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E., White, M.F., 2002. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277, 1531–1537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101521200>
- Ahn, J.-O., Chae, J.-S., Coh, Y.-R., Jung, W.-S., Lee, H.-W., Shin, I.-S., Kang, S.-K., Youn, H.-Y., 2014. Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit T-Cell Lymphoma Growth In Vitro and In Vivo. *Anticancer Research* 34, 4839–4847.
- Akirav, E.M., Preston-Hurlburt, P., Garyu, J., Henegariu, O., Clynes, R., Schmidt, A.M., Herold, K.C., 2012. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PLoS One* 7, e34698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034698>
- Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P., Shaw, J., 2006. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 23, 469–480. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x>
- Ali, M., Heyob, K., Rogers, L.K., 2016. DHA Suppresses Primary Macrophage Inflammatory Responses via Notch 1/ Jagged 1 Signaling. *Sci Rep* 6, 22276. <https://doi.org/10.1038/srep22276>
- Allen, M.J., Fan, Y.-Y., Monk, J.M., Hou, T.Y., Barhoumi, R., McMurray, D.N., Chapkin, R.S., 2014. n-3 PUFAs Reduce T-Helper 17 Cell Differentiation by Decreasing Responsiveness to Interleukin-6 in Isolated Mouse Splenic CD4+ T Cells. *J Nutr* 144, 1306–1313. <https://doi.org/10.3945/jn.114.194407>

- Almuraikhy, S., Kafienah, W., Bashah, M., Diboun, I., Jaganjac, M., Al-Khelaifi, F., Abdesselem, H., Mazloun, N.A., Alsayrafi, M., Mohamed-Ali, V., Elrayess, M.A., 2016. Interleukin-6 induces impairment in human subcutaneous adipogenesis in obesity-associated insulin resistance. *Diabetologia* 59, 2406–2416. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4031-3>
- Amsen, D., Antov, A., Jankovic, D., Sher, A., Radtke, F., Souabni, A., Busslinger, M., McCright, B., Gridley, T., Flavell, R.A., 2007. Direct Regulation of Gata3 Expression Determines the T Helper Differentiation Potential of Notch. *Immunity* 27, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.021>
- Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., Flavell, R.A., 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117, 515–526. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00451-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00451-9)
- Amsen, D., Helbig, C., Backer, R.A., 2015. Notch in T Cell Differentiation: All Things Considered. *Trends Immunol* 36, 802–814. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.10.007>
- Anandacoomarasamy, A., Caterson, I., Sambrook, P., Fransen, M., March, L., 2008. The impact of obesity on the musculoskeletal system. *Int J Obes (Lond)* 32, 211–222. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803715>
- Angoulvant, D., Clerc, A., Benchalal, S., Galambrun, C., Farre, A., Bertrand, Y., Eljaafari, A., 2004. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheology* 41, 469–476.
- Anstey, K.J., Cherbuin, N., Budge, M., Young, J., 2011. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev* 12, e426–437. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00825.x>
- Aoyama, T., Takeshita, K., Kikuchi, R., Yamamoto, K., Cheng, X.W., Liao, J.K., Murohara, T., 2009. gamma-Secretase inhibitor reduces diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 383, 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.154>
- Aparicio, M., Guillén-Astete, C.A., López-Medina, C., Sastre, C., Rodríguez Martínez, F.J., 2021. Evidence for the Use of Secukinumab in Patients with Radiographic and Non-radiographic Axial Spondyloarthritis in the Last 5 Years. *Rheumatol Ther.* <https://doi.org/10.1007/s40744-021-00400-1>
- Appari, M., Channon, K.M., McNeill, E., 2018. Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes. *Antioxid Redox Signal* 29, 297–312. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7060>
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J., 1999. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* 284, 770–776. <https://doi.org/10.1126/science.284.5415.770>
- Aso, Y., Yamamoto, R., Wakabayashi, S., Uchida, T., Takayanagi, K., Takebayashi, K., Okuno, T., Inoue, T., Node, K., Tobe, T., Inukai, T., Nakano, Y., 2006. Comparison of Serum High-Molecular Weight (HMW) Adiponectin With Total Adiponectin Concentrations in Type 2 Diabetic Patients With Coronary Artery Disease Using a Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect HMW Adiponectin. *Diabetes* 55, 1954–1960. <https://doi.org/10.2337/db05-1525>
- Auguet, T., Bertran, L., Binetti, J., Aguilar, C., Martínez, S., Guiu-Jurado, E., Sabench, F., Adalid, L., Porrás, J.A., Riesco, D., Del Castillo, D., Richart, C., 2020. Hepatocyte Notch Signaling Deregulation Related to Lipid Metabolism in Women with Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver. *Obesity (Silver Spring)* 28, 1487–1493. <https://doi.org/10.1002/oby.22873>
- Ayaz, F., Osborne, B.A., 2014. Non-Canonical Notch Signaling in Cancer and Immunity. *Front Oncol* 4, 345. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00345>

- Azaro, A., Massard, C., Tap, W.D., Cassier, P.A., Merchan, J., Italiano, A., Anderson, B., Yuen, E., Yu, D., Oakley, G., Benhadji, K.A., Pant, S., 2021. A phase 1b study of the Notch inhibitor crenigacestat (LY3039478) in combination with other anticancer target agents (taladegib, LY3023414, or abemaciclib) in patients with advanced or metastatic solid tumors. *Invest New Drugs* 39, 1089–1098. <https://doi.org/10.1007/s10637-021-01094-6>
- Badimon, L., Cubedo, J., 2017. Adipose tissue depots and inflammation: effects on plasticity and resident mesenchymal stem cell function. *Cardiovascular Research* 113, 1064–1073. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx096>
- Bailis, W., Pear, W.S., 2012. Notch and PI3K: how is the road traveled? *Blood* 120, 1349–1350. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435099>
- Ballester-López, C., Conlon, T.M., Ertüz, Z., Greiffo, F.R., Irmler, M., Verleden, S.E., Beckers, J., Fernandez, I.E., Eickelberg, O., Yildirim, A.Ö., 2019. The Notch ligand DNER regulates macrophage IFN $\gamma$  release in chronic obstructive pulmonary disease. *EBioMedicine* 43, 562–575. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.054>
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Ahmed, R., 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682–687. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
- Basen-Engquist, K., Chang, M., 2011. Obesity and Cancer Risk: Recent Review and Evidence. *Curr Oncol Rep* 13, 71–76. <https://doi.org/10.1007/s11912-010-0139-7>
- Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V., Latz, E., 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183, 787–791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>
- Baumgard, L.H., Hausman, G.J., Sanz Fernandez, M.V., 2016. Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domestic Animal Endocrinology* 54, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.07.001>
- Baxa, C.A., Sha, R.S., Buelt, M.K., Smith, A.J., Matarese, V., Chinander, L.L., Boundy, K.L., Bernlohr, D.A., 1989. Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry* 28, 8683–8690. <https://doi.org/10.1021/bi00448a003>
- Benci, J.L., Johnson, L.R., Choa, R., Xu, Y., Qiu, J., Zhou, Z., Xu, B., Ye, D., Nathanson, K.L., June, C.H., Wherry, E.J., Zhang, N.R., Ishwaran, H., Hellmann, M.D., Wolchok, J.D., Kambayashi, T., Minn, A.J., 2019. Opposing Functions of Interferon Coordinate Adaptive and Innate Immune Responses to Cancer Immune Checkpoint Blockade. *Cell* 178, 933-948.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.019>
- Benzler, J., Ganjam, G.K., Pretz, D., Oelkrug, R., Koch, C.E., Legler, K., Stöhr, S., Culmsee, C., Williams, L.M., Tups, A., 2015. Central inhibition of IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B signaling attenuates high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *Diabetes* 64, 2015–2027. <https://doi.org/10.2337/db14-0093>
- Berger, N.A., 2018. Young Adult Cancer: Influence of the Obesity Pandemic. *Obesity (Silver Spring)* 26, 641–650. <https://doi.org/10.1002/oby.22137>
- Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., Tran, A., Bouloumié, A., Gual, P., Wakkach, A., 2012. Identification of Adipose Tissue Dendritic Cells Correlated With Obesity-Associated Insulin-Resistance and Inducing Th17 Responses in Mice and Patients. *Diabetes* 61, 2238–2247. <https://doi.org/10.2337/db11-1274>
- Bhaskaran, K., dos-Santos-Silva, I., Leon, D.A., Douglas, I.J., Smeeth, L., 2018. Association of BMI with overall and cause-specific mortality: a population-based cohort study of

- 3.6 million adults in the UK. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 6, 944–953. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30288-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30288-2)
- Bhat, S., Jagadeeshaprasad, M.G., Venkatasubramani, V., Kulkarni, M.J., 2017. Abundance matters: role of albumin in diabetes, a proteomics perspective. *Expert Rev Proteomics* 14, 677–689. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1352473>
- Bi, P., Shan, T., Liu, W., Yue, F., Yang, X., Liang, X.-R., Wang, J., Li, J., Carlesso, N., Liu, X., Kuang, S., 2014. Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity. *Nat Med* 20, 911–918. <https://doi.org/10.1038/nm.3615>
- Bing, C., 2015. Is interleukin-1 $\beta$  a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? *Adipocyte* 4, 149–152. <https://doi.org/10.4161/21623945.2014.979661>
- Blackburn, S.D., Crawford, A., Shin, H., Polley, A., Freeman, G.J., Wherry, E.J., 2010. Tissue-specific differences in PD-1 and PD-L1 expression during chronic viral infection: implications for CD8 T-cell exhaustion. *J Virol* 84, 2078–2089. <https://doi.org/10.1128/JVI.01579-09>
- Blair, H.A., 2021. Secukinumab: A Review in Moderate to Severe Pediatric Plaque Psoriasis. *Paediatr Drugs* 23, 601–608. <https://doi.org/10.1007/s40272-021-00476-w>
- Boniface, K., Bak-Jensen, K.S., Li, Y., Blumenschein, W.M., McGeachy, M.J., McClanahan, T.K., McKenzie, B.S., Kastelein, R.A., Cua, D.J., de Waal Malefyt, R., 2009. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med* 206, 535–548. <https://doi.org/10.1084/jem.20082293>
- Boone, J.E., Gordon-Larsen, P., Adair, L.S., Popkin, B.M., 2007. Screen time and physical activity during adolescence: longitudinal effects on obesity in young adulthood. *Int J Behav Nutr Phys Act* 4, 26. <https://doi.org/10.1186/1479-5868-4-26>
- Boström, P.A., Fernández-Real, J.M., Mantzoros, C., 2014. Irisin in humans: recent advances and questions for future research. *Metabolism* 63, 178–180. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.11.009>
- Bougaret, L., Delort, L., Billard, H., Lequeux, C., Goncalves-Mendes, N., Mojallal, A., Damour, O., Vasson, M.-P., Caldefie-Chezet, F., 2017. Supernatants of Adipocytes From Obese Versus Normal Weight Women and Breast Cancer Cells: In Vitro Impact on Angiogenesis. *J Cell Physiol* 232, 1808–1816. <https://doi.org/10.1002/jcp.25701>
- Bougnoux, P., Hajjaji, N., Ferrasson, M.N., Giraudeau, B., Couet, C., Le Floch, O., 2009. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer* 101, 1978–1985. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605441>
- Bour-Jordan, H., Grogan, J.L., Tang, Q., Auger, J.A., Locksley, R.M., Bluestone, J.A., 2003. CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment. *Nat Immunol* 4, 182–188. <https://doi.org/10.1038/ni884>
- Bray, S., Bernard, F., 2010. Chapter Eight - Notch Targets and Their Regulation, in: Kopan, R. (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology, Notch Signaling*. Academic Press, pp. 253–275. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)92008-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)92008-5)
- Brunetti, L., Di Nisio, C., Recinella, L., Chiavaroli, A., Leone, S., Ferrante, C., Orlando, G., Vacca, M., 2011. Effects of vaspin, chemerin and omentin-1 on feeding behavior and hypothalamic peptide gene expression in the rat. *Peptides* 32, 1866–1871. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.08.003>
- Burghardt, P.R., Kemmerer, E.S., Buck, B.J., Osetek, A.J., Yan, C., Koch, L.G., Britton, S.L., Evans, S.J., 2010. Dietary n-3:n-6 fatty acid ratios differentially influence hormonal signature in a rodent model of metabolic syndrome relative to healthy controls. *Nutr Metab (Lond)* 7, 53. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-53>

- Caër, C., Rouault, C., Le Roy, T., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Torcivia, A., Bichet, J.-C., Clément, K., Guerre-Millo, M., André, S., 2017. Immune cell-derived cytokines contribute to obesity-related inflammation, fibrogenesis and metabolic deregulation in human adipose tissue. *Sci Rep* 7, 3000. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02660-w>
- Calcaterra, V., Croce, S., Vinci, F., De Silvestri, A., Cordaro, E., Regalbuto, C., Zuccotti, G.V., Mameli, C., Albertini, R., Avanzini, M.A., 2020. Th17 and Treg Balance in Children With Obesity and Metabolically Altered Status. *Front Pediatr* 8, 591012. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.591012>
- Calder, P.C., 2020. Eicosanoids. *Essays Biochem* 64, 423–441. <https://doi.org/10.1042/EBC20190083>
- Calder, P.C., 2015. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 1851, 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.08.010>
- Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M.J., 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348, 1625–1638. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021423>
- Canales Rojas, R., 2021. Update on immunotherapy for renal cancer. *Medwave* 21, e8202. <https://doi.org/10.5867/medwave.2021.05.8202>
- Canello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.-L., Bouloumié, A., Barbatelli, G., Cinti, S., Svensson, P.-A., Barsh, G.S., Zucker, J.-D., Basdevant, A., Langin, D., Clément, K., 2005. Reduction of Macrophage Infiltration and Chemoattractant Gene Expression Changes in White Adipose Tissue of Morbidly Obese Subjects After Surgery-Induced Weight Loss. *Diabetes* 54, 2277–2286. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2277>
- Canello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J.L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Bar Hen, A., Bedossa, P., Guerre-Millo, M., Clément, K., 2006. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55, 1554–1561. <https://doi.org/10.2337/db06-0133>
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., Burcelin, R., 2008. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57, 1470–1481. <https://doi.org/10.2337/db07-1403>
- Carlino, M.S., Larkin, J., Long, G.V., 2021. Immune checkpoint inhibitors in melanoma. *Lancet* 398, 1002–1014. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01206-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01206-X)
- Carlsen, H., Haugen, F., Zadelaar, S., Kleemann, R., Kooistra, T., Drevon, C.A., Blomhoff, R., 2009. Diet-induced obesity increases NF-κB signaling in reporter mice. *Genes Nutr* 4, 215–222. <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0133-6>
- Carobbio, S., Pellegrinelli, V., Vidal-Puig, A., 2017. Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol* 960, 161–196. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_7)
- Casula, M., Soranna, D., Catapano, A.L., Corrao, G., 2013. Long-term effect of high dose omega-3 fatty acid supplementation for secondary prevention of cardiovascular outcomes: A meta-analysis of randomized, placebo controlled trials [corrected]. *Atheroscler Suppl* 14, 243–251. [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(13\)70005-9](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(13)70005-9)
- Ceccarelli, S., Pontecorvi, P., Anastasiadou, E., Napoli, C., Marchese, C., 2020. Immunomodulatory Effect of Adipose-Derived Stem Cells: The Cutting Edge of Clinical Application. *Front Cell Dev Biol* 8, 236. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00236>

- Cena, H., Fonte, M.L., Turconi, G., 2011. Relationship between smoking and metabolic syndrome. *Nutr Rev* 69, 745–753. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00446.x>
- Chakaroun, R., Raschpichler, M., Klötting, N., Oberbach, A., Flehmig, G., Kern, M., Schön, M.R., Shang, E., Lohmann, T., Dreßler, M., Fasshauer, M., Stumvoll, M., Blüher, M., 2012. Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Metabolism* 61, 706–714. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.10.008>
- Chang, C.-H., Curtis, J.D., Maggi, L.B., Faubert, B., Villarino, A.V., O’Sullivan, D., Huang, S.C.-C., van der Windt, G.J.W., Blagih, J., Qiu, J., Weber, J.D., Pearce, E.J., Jones, R.G., Pearce, E.L., 2013. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 153, 1239–1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.016>
- Chehimi, M., Robert, M., Bechwaty, M.E., Vial, G., Rieusset, J., Vidal, H., Pirola, L., Eljaafari, A., 2016. Adipocytes, like their progenitors, contribute to inflammation of adipose tissues through promotion of Th-17 cells and activation of monocytes, in obese subjects. *Adipocyte* 5, 275–282. <https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1134402>
- Chehimi, M., Vidal, H., Eljaafari, A., 2017. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. *J Clin Med* 6. <https://doi.org/10.3390/jcm6070068>
- Chen, H., Ren, X., Liao, N., Wen, F., 2016. Th17 cell frequency and IL-17A concentrations in peripheral blood mononuclear cells and vitreous fluid from patients with diabetic retinopathy. *J Int Med Res* 44, 1403–1413. <https://doi.org/10.1177/0300060516672369>
- Chen, L., Han, X., 2015. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest* 125, 3384–3391. <https://doi.org/10.1172/JCI80011>
- Chen, Y., Tian, J., Tian, X., Tang, X., Rui, K., Tong, J., Lu, L., Xu, H., Wang, S., 2014. Adipose tissue dendritic cells enhances inflammation by prompting the generation of Th17 cells. *PLoS One* 9, e92450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092450>
- Chen, Y., Wang, L., Pitzer, A.L., Li, X., Li, P.-L., Zhang, Y., 2016. Contribution of redox-dependent activation of endothelial Nlrp3 inflammasomes to hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *J Mol Med (Berl)* 94, 1335–1347. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1481-5>
- Chillakuri, C.R., Sheppard, D., Lea, S.M., Handford, P.A., 2012. Notch receptor–ligand binding and activation: Insights from molecular studies. *Semin Cell Dev Biol* 23, 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.009>
- Cho, O.H., Shin, H.M., Miele, L., Golde, T.E., Fauq, A., Minter, L.M., Osborne, B.A., 2009. Notch Regulates Cytolytic Effector Function in CD8+ T Cells. *J Immunol* 182, 3380–3389. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802598>
- Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., Kim, J.B., 2016. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7, 30. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
- Chowdhury, R., Warnakula, S., Kunutsor, S., Crowe, F., Ward, H.A., Johnson, L., Franco, O.H., Butterworth, A.S., Forouhi, N.G., Thompson, S.G., Khaw, K.-T., Mozaffarian, D., Danesh, J., Di Angelantonio, E., 2014. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 160, 398–406. <https://doi.org/10.7326/M13-1788>
- Christakis, N.A., Fowler, J.H., 2007. The Spread of Obesity in a Large Social Network over 32 Years. *New England Journal of Medicine* 357, 370–379. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa066082>
- Christodoulides, C., Lagathu, C., Sethi, J.K., Vidal-Puig, A., 2009. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab* 20, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.09.002>

- Chylikova, J., Dvorackova, J., Tauber, Z., Kamarad, V., 2018. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 162, 79–82. <https://doi.org/10.5507/bp.2018.015>
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., Obin, M.S., 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46, 2347–2355. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>
- Coats, B.R., Schoenfelt, K.Q., Barbosa-Lorenzi, V.C., Peris, E., Cui, C., Hoffman, A., Zhou, G., Fernandez, S., Zhai, L., Hall, B.A., Haka, A.S., Shah, A.M., Reardon, C.A., Brady, M.J., Rhodes, C., Maxfield, F.R., Becker, L., 2017. Metabolically activated adipose tissue macrophages perform detrimental and beneficial functions during diet-induced obesity. *Cell Rep* 20, 3149–3161. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.096>
- Cohen, M.P., Shea, E., Chen, S., Shearman, C.W., 2003. Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-beta 1 production in macrophage RAW cells. *J Lab Clin Med* 141, 242–249. <https://doi.org/10.1067/mlc.2003.27>
- Collins, M., Michot, J.-M., Bellanger, C., Mussini, C., Benhadji, K., Massard, C., Carbonnel, F., 2021. Notch inhibitors induce diarrhea, hypercrinia and secretory cell metaplasia in the human colon. *EXCLI J* 20, 819–827. <https://doi.org/10.17179/excli2021-3572>
- Conti, H.R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J.N., Lindemann, M.J., Ho, A.W., Hai, J.H., Yu, J.J., Jung, J.W., Filler, S.G., Masso-Welch, P., Edgerton, M., Gaffen, S.L., 2009. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 206, 299–311. <https://doi.org/10.1084/jem.20081463>
- Cook, K.S., Min, H.Y., Johnson, D., Chaplinsky, R.J., Flier, J.S., Hunt, C.R., Spiegelman, B.M., 1987. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 237, 402–405. <https://doi.org/10.1126/science.3299705>
- Copps, K.D., White, M.F., 2012. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 55, 2565–2582. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., Uccelli, A., 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367–372. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657>
- Cordle, J., Johnson, S., Tay, J.Z.Y., Roversi, P., Wilkin, M.B., de Madrid, B.H., Shimizu, H., Jensen, S., Whiteman, P., Jin, B., Redfield, C., Baron, M., Lea, S.M., Handford, P.A., 2008. A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 15, 849–857. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1457>
- Cortez-Espinosa, N., Cortés-García, J.D., Martínez-Leija, E., Rodríguez-Rivera, J.G., Barajas-López, C., González-Amaro, R., Portales-Pérez, D.P., 2015. CD39 expression on Treg and Th17 cells is associated with metabolic factors in patients with type 2 diabetes. *Hum Immunol* 76, 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.09.007>
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., Low, M.J., 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480–484. <https://doi.org/10.1038/35078085>
- Crane, D.D., Bauler, T.J., Wehrly, T.D., Bosio, C.M., 2014. Mitochondrial ROS potentiates indirect activation of the AIM2 inflammasome. *Front Microbiol* 5, 438. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00438>

- Crooks, S.W., Stockley, R.A., 1998. Leukotriene B4. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 173–178. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(97\)00123-4](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(97)00123-4)
- Crop, M.J., Baan, C.C., Korevaar, S.S., Ijzermans, J.N.M., Pescatori, M., Stubbs, A.P., van Ijcken, W.F.J., Dahlke, M.H., Eggenhofer, E., Weimar, W., Hoogdijjn, M.J., 2010. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 162, 474–486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04256.x>
- Crowson, C.S., Matteson, E.L., Davis, J.M., Gabriel, S.E., 2013. Contribution of Obesity to the Rise in Incidence of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 65, 71–77. <https://doi.org/10.1002/acr.21660>
- Dalmas, E., Toubal, A., Alzaid, F., Blazek, K., Eames, H.L., Lebozec, K., Pini, M., Hainault, I., Montastier, E., Denis, R.G.P., Ancel, P., Lacombe, A., Ling, Y., Allatif, O., Cruciani-Guglielmacci, C., André, S., Viguerie, N., Poitou, C., Stich, V., Torcivia, A., Foufelle, F., Luquet, S., Aron-Wisnewsky, J., Langin, D., Clément, K., Udalova, I.A., Venteclef, N., 2015. Irf5 deficiency in macrophages promotes beneficial adipose tissue expansion and insulin sensitivity during obesity. *Nat Med* 21, 610–618. <https://doi.org/10.1038/nm.3829>
- Dalmas, E., Venteclef, N., Caer, C., Poitou, C., Cremer, I., Aron-Wisnewsky, J., Lacroix-Desmazes, S., Bayry, J., Kaveri, S.V., Clément, K., André, S., Guerre-Millo, M., 2014. T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 63, 1966–1977. <https://doi.org/10.2337/db13-1511>
- Dandawate, P., Subramaniam, D., Panovich, P., Standing, D., Krishnamachary, B., Kaushik, G., Thomas, S.M., Dhar, A., Weir, S.J., Jensen, R.A., Anant, S., 2020. Cucurbitacin B and I inhibits colon cancer growth by targeting the Notch signaling pathway. *Sci Rep* 10, 1290. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57940-9>
- De Girolamo, L., Stanco, D., Salvatori, L., Coroniti, G., Arrigoni, E., Silecchia, G., Russo, M.A., Niada, S., Petrangeli, E., Brini, A.T., 2013. Stemness and osteogenic and adipogenic potential are differently impaired in subcutaneous and visceral adipose derived stem cells (ASCs) isolated from obese donors. *Int J Immunopathol Pharmacol* 26, 11–21. <https://doi.org/10.1177/03946320130260S103>
- de Graaff, E., Maat, P., Hulsenboom, E., van den Berg, R., van den Bent, M., Demmers, J., Lugtenburg, P.J., Hoogenraad, C.C., Sillevius Smitt, P., 2012. Identification of delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor as the Tr antigen in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 71, 815–824. <https://doi.org/10.1002/ana.23550>
- de Jong, E.C., Smits, H.H., Kapsenberg, M.L., 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 26, 289–307. <https://doi.org/10.1007/s00281-004-0167-1>
- de Souza Batista, C.M., Yang, R.-Z., Lee, M.-J., Glynn, N.M., Yu, D.-Z., Pray, J., Ndubuizu, K., Patil, S., Schwartz, A., Kligman, M., Fried, S.K., Gong, D.-W., Shuldiner, A.R., Pollin, T.I., McLenithan, J.C., 2007. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* 56, 1655–1661. <https://doi.org/10.2337/db06-1506>
- Deiuliis, J., Shah, Z., Shah, N., Needleman, B., Mikami, D., Narula, V., Perry, K., Hazey, J., Kampfrath, T., Kollengode, M., Sun, Q., Satoskar, A.R., Lumeng, C., Moffatt-Bruce, S., Rajagopalan, S., 2011. Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers. *PLoS One* 6, e16376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016376>

- Deng, T., Lyon, C.J., Bergin, S., Caligiuri, M.A., Hsueh, W.A., 2016. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu Rev Pathol* 11, 421–449. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044359>
- Deng, Z., Shen, J., Ye, J., Shu, Q., Zhao, J., Fang, M., Zhang, T., 2015. Association between single nucleotide polymorphisms of delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor (DNER) and Delta-like 1 Ligand (DLL 1) with the risk of type 2 diabetes mellitus in a Chinese Han population. *Cell Biochem Biophys* 71, 331–335. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0202-3>
- Desouza, C.V., 2010. An overview of salsalate as a potential antidiabetic therapy. *Drugs Today (Barc)* 46, 847–853. <https://doi.org/10.1358/dot.2010.46.11.1534820>
- Després, J.-P., Lemieux, I., 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881–887. <https://doi.org/10.1038/nature05488>
- Devêvre, E.F., Renovato-Martins, M., Clément, K., Sautès-Fridman, C., Cremer, I., Poitou, C., 2015. Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity. *J Immunol* 194, 3917–3923. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402655>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- D'SOUZA, B., MELOTY-KAPPELLA, L., WEINMASTER, G., 2010. Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr Top Dev Biol* 92, 73–129. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)92003-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)92003-6)
- Dubern, B., Clement, K., 2012. Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. *Biochimie* 94, 2111–2115. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.05.010>
- Dumas, K., Ayachi, C., Gilleron, J., Lacas-Gervais, S., Pastor, F., Favier, F.B., Peraldi, P., Vaillant, N., Yvan-Charvet, L., Bonnafous, S., Patouraux, S., Anty, R., Tran, A., Gual, P., Cormont, M., Tanti, J.-F., Giorgetti-Peraldi, S., 2020. REDD1 deficiency protects against nonalcoholic hepatic steatosis induced by high-fat diet. *FASEB J* 34, 5046–5060. <https://doi.org/10.1096/fj.201901799RR>
- Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Sul, H.S., 2007. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 27, 79–101. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734>
- Durning, S.P., Preston-Hurlburt, P., Clark, P.R., Xu, D., Herold, K.C., Type 1 Diabetes TrialNet Study Group, 2016. The Receptor for Advanced Glycation Endproducts Drives T Cell Survival and Inflammation in Type 1 Diabetes Mellitus. *J Immunol* 197, 3076–3085. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600197>
- Egert, S., Baxheinrich, A., Lee-Barkey, Y.H., Tschoepe, D., Wahrburg, U., Stratmann, B., 2014. Effects of an energy-restricted diet rich in plant-derived  $\alpha$ -linolenic acid on systemic inflammation and endothelial function in overweight-to-obese patients with metabolic syndrome traits. *Br J Nutr* 112, 1315–1322. <https://doi.org/10.1017/S0007114514002001>
- Eiraku, M., Hirata, Y., Takeshima, H., Hirano, T., Kengaku, M., 2002. Delta/Notch-like Epidermal Growth Factor (EGF)-related Receptor, a Novel EGF-like Repeat-containing Protein Targeted to Dendrites of Developing and Adult Central Nervous System Neurons \*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25400–25407. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110793200>
- Eiraku, M., Tohgo, A., Ono, K., Kaneko, M., Fujishima, K., Hirano, T., Kengaku, M., 2005. DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci* 8, 873–880. <https://doi.org/10.1038/nn1492>

- El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.-X., Dittel, B.N., Rostami, A., 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12, 568–575. <https://doi.org/10.1038/ni.2031>
- Eleuteri, S., Fierabracci, A., 2019. Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *Int J Mol Sci* 20, E4597. <https://doi.org/10.3390/ijms20184597>
- Eljaafari, A., Robert, M., Chehimi, M., Chanon, S., Durand, C., Vial, G., Bendridi, N., Madec, A.-M., Disse, E., Laville, M., Rieusset, J., Lefai, E., Vidal, H., Pirola, L., 2015a. Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. *Diabetes* 64, 2477–2488. <https://doi.org/10.2337/db15-0162>
- Eljaafari, A., Robert, M., Chehimi, M., Chanon, S., Durand, C., Vial, G., Bendridi, N., Madec, A.-M., Disse, E., Laville, M., Rieusset, J., Lefai, E., Vidal, H., Pirola, L., 2015b. Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. *Diabetes* 64, 2477–2488. <https://doi.org/10.2337/db15-0162>
- Eljaafari, A., Tartelin, M.-L., Aissaoui, H., Chevrel, G., Osta, B., Lavocat, F., Miossec, P., 2012. Bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal cells promote Th17 cell expansion and activation through caspase 1 activation: contribution to the chronicity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 2147–2157. <https://doi.org/10.1002/art.34391>
- Emamaullee, J.A., Davis, J., Merani, S., Toso, C., Elliott, J.F., Thiesen, A., Shapiro, A.M.J., 2009. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 58, 1302–1311. <https://doi.org/10.2337/db08-1113>
- Endo, Y., Asou, H.K., Matsugae, N., Hirahara, K., Shinoda, K., Tumes, D.J., Tokuyama, H., Yokote, K., Nakayama, T., 2015. Obesity Drives Th17 Cell Differentiation by Inducing the Lipid Metabolic Kinase, ACC1. *Cell Rep* 12, 1042–1055. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.014>
- Estève, D., Boulet, N., Belles, C., Zakaroff-Girard, A., Decaunes, P., Briot, A., Veeranagouda, Y., Didier, M., Rémaury, A., Guillemot, J.C., Ledoux, S., Dani, C., Bouloumié, A., Galitzky, J., 2019. Lobular architecture of human adipose tissue defines the niche and fate of progenitor cells. *Nat Commun* 10, 2549. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09992-3>
- Estève, D., Boulet, N., Volat, F., Zakaroff-Girard, A., Ledoux, S., Coupaye, M., Decaunes, P., Belles, C., Gaits-Iacovoni, F., Iacovoni, J.S., Rémaury, A., Castel, B., Ferrara, P., Heymes, C., Lafontan, M., Bouloumié, A., Galitzky, J., 2015. Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells. *Stem Cells* 33, 1277–1291. <https://doi.org/10.1002/stem.1916>
- Fabbrini, E., Cella, M., McCartney, S.A., Fuchs, A., Abumrad, N.A., Pietka, T.A., Chen, Z., Finck, B.N., Han, D.H., Magkos, F., Conte, C., Bradley, D., Fraterrigo, G., Eagon, J.C., Patterson, B.W., Colonna, M., Klein, S., 2013. Association between specific adipose tissue CD4+ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* 145, 366-374.e1–3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.010>
- Fabre, J.A.S., Giustiniani, J., Garbar, C., Merrouche, Y., Antonicelli, F., Bensussan, A., 2018. The Interleukin-17 Family of Cytokines in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 19, 3880. <https://doi.org/10.3390/ijms19123880>

- Fain, J.N., Bahouth, S.W., Madan, A.K., 2004. TNF $\alpha$  release by the nonfat cells of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 616–622. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802594>
- Fan, C., Zhang, Y., Wang, J., Cheng, J., 2018. Roles of Hedgehog signaling pathway in adipogenic differentiation potential of porcine adipose-derived mesenchymal stem cells. *R. Bras. Zootec.* 47. <https://doi.org/10.1590/rbz4720170019>
- Fang, H., Judd, R.L., 2018. Adiponectin Regulation and Function. *Compr Physiol* 8, 1031–1063. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170046>
- Fang, T.C., Yashiro-Ohtani, Y., Del Bianco, C., Knoblock, D.M., Blacklow, S.C., Pear, W.S., 2007. Notch Directly Regulates Gata3 Expression during T Helper 2 Cell Differentiation. *Immunity* 27, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.018>
- Farmer, S.R., 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism* 4, 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.001>
- Feng, R., Li, Y., Wang, C., Luo, C., Liu, L., Chuo, F., Li, Q., Sun, C., 2014. Higher vaspin levels in subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 106, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.07.026>
- Feng, X., Xu, X., Shi, Y., Liu, X., Liu, H., Hou, H., Ji, L., Li, Y., Wang, W., Wang, Y., Li, D., 2019. Body Mass Index and the Risk of Rheumatoid Arthritis: An Updated Dose-Response Meta-Analysis. *Biomed Res Int* 2019, 3579081. <https://doi.org/10.1155/2019/3579081>
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., Mathis, D., 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15, 930–939. <https://doi.org/10.1038/nm.2002>
- Fève, B., Mercier, N., 2007. Adipocyte, une cellule en devenir. *MT Cardio* 3, 6–17. <https://doi.org/10.1684/mtc.2007.0051>
- Flyvbjerg, A., Denner, L., Schrijvers, B.F., Tilton, R.G., Mogensen, T.H., Paludan, S.R., Rasch, R., 2004. Long-Term Renal Effects of a Neutralizing RAGE Antibody in Obese Type 2 Diabetic Mice. *Diabetes* 53, 166–172. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.1.166>
- Franquesa, M., Mensah, F.K., Huizinga, R., Strini, T., Boon, L., Lombardo, E., DelaRosa, O., Laman, J.D., Grinyó, J.M., Weimar, W., Betjes, M.G.H., Baan, C.C., Hoogduijn, M.J., 2015. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells* 33, 880–891. <https://doi.org/10.1002/stem.1881>
- Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., Macdonald, I.A., Coppack, S.W., 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *International Journal of Obesity* 27, 875–888. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802326>
- Fried, S.K., Russell, C.D., Grauso, N.L., Brolin, R.E., 1993. Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J Clin Invest* 92, 2191–2198.
- Friedman, J., 2016. The long road to leptin. *J Clin Invest* 126, 4727–4734. <https://doi.org/10.1172/JCI91578>
- Friedman, J.M., Leibel, R.L., Siegel, D.S., Walsh, J., Bahary, N., 1991. Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* 11, 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90032-a](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90032-a)
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., Ferrara, G.B., 2002. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* 196, 459–468. <https://doi.org/10.1084/jem.20020121>

- Fujii, M., Inoguchi, T., Batchuluun, B., Sugiyama, N., Kobayashi, K., Sonoda, N., Takayanagi, R., 2013. CTLA-4Ig immunotherapy of obesity-induced insulin resistance by manipulation of macrophage polarization in adipose tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 438, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.034>
- Fukuda, D., Aikawa, E., Swirski, F.K., Novobrantseva, T.I., Kotelianski, V., Gorgun, C.Z., Chudnovskiy, A., Yamazaki, H., Croce, K., Weissleder, R., Aster, J.C., Hotamisligil, G.S., Yagita, H., Aikawa, M., 2012. Notch ligand delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1868-1877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116889109>
- Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa, Y., Shimomura, I., 2005. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307, 426–430. <https://doi.org/10.1126/science.1097243>
- Gaffen, S.L., 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9, 556–567. <https://doi.org/10.1038/nri2586>
- Gagnon, A., Foster, C., Landry, A., Sorisky, A., 2013. The role of interleukin 1 $\beta$  in the anti-adipogenic action of macrophages on human preadipocytes. *Journal of Endocrinology* 217, 197–206. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0565>
- Gangwisch, J.E., Malaspina, D., Boden-Albala, B., Heymsfield, S.B., 2005. Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES I. *Sleep* 28, 1289–1296. <https://doi.org/10.1093/sleep/28.10.1289>
- Gao, F., Chiu, S.M., Motan, D.A.L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H.-L., Tse, H.-F., Fu, Q.-L., Lian, Q., 2016. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 7, e2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>
- Gao, H., Volat, F., Sandhow, L., Galitzky, J., Nguyen, T., Esteve, D., Åström, G., Mejhert, N., Ledoux, S., Thalamas, C., Arner, P., Guillemot, J.-C., Qian, H., Rydén, M., Bouloumié, A., 2017. CD36 Is a Marker of Human Adipocyte Progenitors with Pronounced Adipogenic and Triglyceride Accumulation Potential. *Stem Cells* 35, 1799–1814. <https://doi.org/10.1002/stem.2635>
- Gao, L., Cao, J., Mao, Q., Lu, X., Zhou, X., Fan, L., 2013. Influence of omega-3 polyunsaturated fatty acid-supplementation on platelet aggregation in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 226, 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.056>
- Gesta, S., Tseng, Y.-H., Kahn, C.R., 2007. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* 131, 242–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004>
- Ghaben, A.L., Scherer, P.E., 2019. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 242–258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>
- Ghannam, S., Pène, J., Moquet-Torcy, G., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C., Yssel, H., 2010. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 185, 302–312. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902007>
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., Grainger, J.R., Chen, Q., Kanno, Y., Watford, W.T., Sun, H.-W., Eberl, G., Shevach, E.M., Belkaid, Y., Cua, D.J., Chen, W., O’Shea, J.J., 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling. *Nature* 467, 967–971. <https://doi.org/10.1038/nature09447>

- Giacobbe, J., Benoiton, B., Zunszain, P., Pariante, C.M., Borsini, A., 2020. The Anti-Inflammatory Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Metabolites in Pre-Clinical Models of Psychiatric, Neurodegenerative, and Neurological Disorders. *Frontiers in Psychiatry* 11, 122. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00122>
- Gianfrancesco, M.A., Barcellos, L.F., 2016. Obesity and Multiple Sclerosis Susceptibility: A Review. *J Neurol Neuromedicine* 1, 1–5.
- Gil-Campos, M., Cañete, R.R., Gil, A., 2004. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* 23, 963–974. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.04.010>
- Gillman, M.W., 2005. Developmental Origins of Health and Disease. *N Engl J Med* 353, 1848–1850. <https://doi.org/10.1056/NEJMe058187>
- Gioxari, A., Kaliora, A.C., Marantidou, F., Panagiotakos, D.P., 2018. Intake of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition* 45, 114-124.e4. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.06.023>
- Goldfine, A.B., Fonseca, V., Jablonski, K.A., Pyle, L., Staten, M.A., Shoelson, S.E., TINSAL-T2D (Targeting Inflammation Using Salsalate in Type 2 Diabetes) Study Team, 2010. The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med* 152, 346–357. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-6-201003160-00004>
- González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F.B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R.J.F., Moreno, L.A., Bray, G.A., Martínez, J.A., 2017. Obesity. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17034. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>
- Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., Blacklow, S.C., 2007. Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat Struct Mol Biol* 14, 295–300. <https://doi.org/10.1038/nsmb1227>
- Gordon, W.R., Zimmerman, B., He, L., Miles, L.J., Huang, J., Tiyanont, K., McArthur, D.G., Aster, J.C., Perrimon, N., Loparo, J.J., Blacklow, S.C., 2015. Mechanical Allostery: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. *Developmental Cell* 33, 729–736. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.004>
- Green, H., Kehinde, O., 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5, 19–27. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90087-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90087-2)
- Gupta, K., Krishnaswamy, G., Karnad, A., Peiris, A.N., 2002. Insulin: a novel factor in carcinogenesis. *Am J Med Sci* 323, 140–145. <https://doi.org/10.1097/00000441-200203000-00004>
- Gustafson, B., Smith, U., 2006. Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 281, 9507–9516. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512077200>
- Gyllenhammer, L. E., Alderete, T.L., Toledo-Corral, C.M., Weigensberg, M., Goran, M.I., 2016. Saturation of subcutaneous adipose tissue expansion and accumulation of ectopic fat associated with metabolic dysfunction during late and post-pubertal growth. *Int J Obes (Lond)* 40, 601–606. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.207>
- Gyllenhammer, Lauren E., Lam, J., Alderete, T.L., Allayee, H., Akbari, O., Katkhouda, N., Goran, M.I., 2016. Lower omental t-regulatory cell count is associated with higher fasting glucose and lower  $\beta$ -cell function in adults with obesity. *Obesity (Silver Spring)* 24, 1274–1282. <https://doi.org/10.1002/oby.21507>
- Haghiac, M., Yang, X., Presley, L., Smith, S., Dettelback, S., Minium, J., Belury, M.A., Catalano, P.M., Hauguel-de Mouzon, S., 2015. Dietary Omega-3 Fatty Acid Supplementation Reduces Inflammation in Obese Pregnant Women: A Randomized Double-Blind Controlled Clinical Trial. *PLoS One* 10, e0137309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137309>

- Haghighatdoost, F., Amini, M., Feizi, A., Iraj, B., 2017. Are body mass index and waist circumference significant predictors of diabetes and prediabetes risk: Results from a population based cohort study. *World J Diabetes* 8, 365–373. <https://doi.org/10.4239/wjd.v8.i7.365>
- Hald, J., Galbo, T., Rescan, C., Radzikowski, L., Sprinkel, A.E., Heimberg, H., Ahnfelt-Rønne, J., Jensen, J., Scharfmann, R., Gradwohl, G., Kaestner, K.H., Stoeckert, C., Jensen, J.N., Madsen, O.D., 2012a. Pancreatic islet and progenitor cell surface markers with cell sorting potential. *Diabetologia* 55, 154–165. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2295-1>
- Hald, J., Galbo, T., Rescan, C., Radzikowski, L., Sprinkel, A.E., Heimberg, H., Ahnfelt-Rønne, J., Jensen, J., Scharfmann, R., Gradwohl, G., Kaestner, K.H., Stoeckert, C., Jensen, J.N., Madsen, O.D., 2012b. Pancreatic islet and progenitor cell surface markers with cell sorting potential. *Diabetologia* 55, 154–165. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2295-1>
- Hambleton, S., Valeyev, N.V., Muranyi, A., Knott, V., Werner, J.M., McMichael, A.J., Handford, P.A., Downing, A.K., 2004. Structural and Functional Properties of the Human Notch-1 Ligand Binding Region. *Structure* 12, 2173–2183. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.09.012>
- Han, X.-Q., Gong, Z.-J., Xu, S.-Q., Li, X., Wang, L.-K., Wu, S.-M., Wu, J.-H., Yang, H.-F., 2014. Advanced glycation end products promote differentiation of CD4(+) T helper cells toward pro-inflammatory response. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 34, 10–17. <https://doi.org/10.1007/s11596-014-1224-1>
- Hanson, R.L., Muller, Y.L., Kobes, S., Guo, T., Bian, L., Ossowski, V., Wiedrich, K., Sutherland, J., Wiedrich, C., Mahke, D., Huang, K., Abdussamad, M., Traurig, M., Weil, E.J., Nelson, R.G., Bennett, P.H., Knowler, W.C., Bogardus, C., Baier, L.J., 2014a. A genome-wide association study in American Indians implicates DNER as a susceptibility locus for type 2 diabetes. *Diabetes* 63, 369–376. <https://doi.org/10.2337/db13-0416>
- Hanson, R.L., Muller, Y.L., Kobes, S., Guo, T., Bian, L., Ossowski, V., Wiedrich, K., Sutherland, J., Wiedrich, C., Mahke, D., Huang, K., Abdussamad, M., Traurig, M., Weil, E.J., Nelson, R.G., Bennett, P.H., Knowler, W.C., Bogardus, C., Baier, L.J., 2014b. A genome-wide association study in American Indians implicates DNER as a susceptibility locus for type 2 diabetes. *Diabetes* 63, 369–376. <https://doi.org/10.2337/db13-0416>
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T., 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123–1132. <https://doi.org/10.1038/ni1254>
- Harrison, M.A.A., Wise, R.M., Benjamin, B.P., Hochreiner, E.M., Mohiuddin, O.A., Bunnell, B.A., 2020. Adipose-Derived Stem Cells from Obese Donors Polarize Macrophages and Microglia toward a Pro-Inflammatory Phenotype. *Cells* 10, E26. <https://doi.org/10.3390/cells10010026>
- Hartweg, J., Farmer, A.J., Holman, R.R., Neil, A., 2009. Potential impact of omega-3 treatment on cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Curr Opin Lipidol* 20, 30–38. <https://doi.org/10.1097/mol.0b013e328321b3be>
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2012. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26, 203–234. <https://doi.org/10.1101/gad.183434.111>
- Heiker, J.T., Klötting, N., Kovacs, P., Kuettner, E.B., Sträter, N., Schultz, S., Kern, M., Stumvoll, M., Blüher, M., Beck-Sickinger, A.G., 2013. Vaspin inhibits kallikrein 7 by

- serpin mechanism. *Cell Mol Life Sci* 70, 2569–2583. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1258-8>
- Heni, M., Machann, J., Staiger, H., Schwenzer, N.F., Peter, A., Schick, F., Claussen, C.D., Stefan, N., Häring, H.-U., Fritsche, A., 2010. Pancreatic fat is negatively associated with insulin secretion in individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance: a nuclear magnetic resonance study. *Diabetes Metab Res Rev* 26, 200–205. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1073>
- Heo, J.S., Choi, Y., Kim, H.O., 2019. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote M2 Macrophage Phenotype through Exosomes. *Stem Cells Int* 2019, 7921760. <https://doi.org/10.1155/2019/7921760>
- Herder, C., Kannenberg, J.M., Carstensen-Kirberg, M., Strom, A., Bönhof, G.J., Rathmann, W., Huth, C., Koenig, W., Heier, M., Krumsiek, J., Peters, A., Meisinger, C., Roden, M., Thorand, B., Ziegler, D., 2018. A Systemic Inflammatory Signature Reflecting Cross Talk Between Innate and Adaptive Immunity Is Associated With Incident Polyneuropathy: KORA F4/FF4 Study. *Diabetes* 67, 2434–2442. <https://doi.org/10.2337/db18-0060>
- Herrera, B.M., Keildson, S., Lindgren, C.M., 2011. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas* 69, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.02.018>
- Hidayat, K., Yang, J., Zhang, Z., Chen, G.-C., Qin, L.-Q., Eggersdorfer, M., Zhang, W., 2018. Effect of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on heart rate: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr* 72, 805–817. <https://doi.org/10.1038/s41430-017-0052-3>
- Higurashi, T., Hosono, K., Endo, H., Takahashi, H., Iida, H., Uchiyama, T., Ezuka, A., Uchiyama, S., Yamada, E., Ohkubo, H., Sakai, E., Maeda, S., Morita, S., Natsumeda, Y., Nagase, H., Nakajima, A., 2012. Eicosapentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a double-blind randomized controlled trial. *BMC Cancer* 12, 413. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-413>
- Hoffstedt, J., Arner, E., Wahrenberg, H., Andersson, D.P., Qvisth, V., Löfgren, P., Rydén, M., Thörne, A., Wirén, M., Palmér, M., Thorell, A., Toft, E., Arner, P., 2010. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia* 53, 2496–2503. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1889-3>
- Holland, W.L., Miller, R.A., Wang, Z.V., Sun, K., Barth, B.M., Bui, H.H., Davis, K.E., Bikman, B.T., Halberg, N., Rutkowski, J.M., Wade, M.R., Tenorio, V.M., Kuo, M.-S., Brozinick, J.T., Zhang, B.B., Birnbaum, M.J., Summers, S.A., Scherer, P.E., 2011. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med* 17, 55–63. <https://doi.org/10.1038/nm.2277>
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., Spiegelman, B.M., 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95, 2409–2415. <https://doi.org/10.1172/JCI117936>
- Hu, F.B., Li, T.Y., Colditz, G.A., Willett, W.C., Manson, J.E., 2003. Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and type 2 diabetes mellitus in women. *JAMA* 289, 1785–1791. <https://doi.org/10.1001/jama.289.14.1785>
- Hu, W., Wang, R., Li, J., Zhang, J., Wang, W., 2016. Association of irisin concentrations with the presence of diabetic nephropathy and retinopathy. *Ann Clin Biochem* 53, 67–74. <https://doi.org/10.1177/0004563215582072>

- Huang, W., Na, L., Fidel, P.L., Schwarzenberger, P., 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 190, 624–631. <https://doi.org/10.1086/422329>
- Huang, Y.-S., Pereira, S.L., Leonard, A.E., 2004. Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochimie* 86, 793–798. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.019>
- Huber, J., Kiefer, F.W., Zeyda, M., Ludvik, B., Silberhumer, G.R., Prager, G., Zlabinger, G.J., Stulnig, T.M., 2008. CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3215–3221. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2630>
- Huh, J.Y., Park, Y.J., Ham, M., Kim, J.B., 2014. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol Cells* 37, 365–371. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0074>
- Huppke, B., Ellenberger, D., Hummel, H., Stark, W., Röbl, M., Gärtner, J., Huppke, P., 2019. Association of Obesity With Multiple Sclerosis Risk and Response to First-line Disease Modifying Drugs in Children. *JAMA Neurol* 76, 1157–1165. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1997>
- Hwang, D.H., Kim, J.-A., Lee, J.Y., 2016. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *Eur J Pharmacol* 785, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.024>
- Ibrahimi, A., Abumrad, N.A., 2002. Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 139–145. <https://doi.org/10.1097/00075197-200203000-00004>
- Ingalls, A.M., Dickie, M.M., Snell, G.D., 1950. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 41, 317–318. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106073>
- Ingram, J.R., Dougan, M., Rashidian, M., Knoll, M., Keliher, E.J., Garrett, S., Garforth, S., Blomberg, O.S., Espinosa, C., Bhan, A., Almo, S.C., Weissleder, R., Lodish, H., Dougan, S.K., Ploegh, H.L., 2017. PD-L1 is an activation-independent marker of brown adipocytes. *Nat Commun* 8, 647. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00799-8>
- Ip, B., Cilfone, N.A., Belkina, A.C., DeFuria, J., Jagannathan-Bogdan, M., Zhu, M., Kuchibhatla, R., McDonnell, M.E., Xiao, Q., Kepler, T.B., Apovian, C.M., Lauffenburger, D.A., Nikolajczyk, B.S., 2016. Th17 cytokines differentiate obesity from obesity-associated type 2 diabetes and promote TNF $\alpha$  production. *Obesity (Silver Spring)* 24, 102–112. <https://doi.org/10.1002/oby.21243>
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T., 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11, 3887–3895.
- Itariu, B.K., Zeyda, M., Hochbrugger, E.E., Neuhofer, A., Prager, G., Schindler, K., Bohdjalian, A., Mascher, D., Vangala, S., Schranz, M., Krebs, M., Bischof, M.G., Stulnig, T.M., 2012. Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 96, 1137–1149. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.037432>
- Ivanova-Todorova, E., Bochev, I., Mourdjeva, M., Dimitrov, R., Bukarev, D., Kyurkchiev, S., Tivchev, P., Altunkova, I., Kyurkchiev, D.S., 2009. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 126, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.07.010>
- Iwamoto, S., Iwai, S., Tsujiyama, K., Kurahashi, C., Takeshita, K., Naoe, M., Masunaga, A., Ogawa, Y., Oguchi, K., Miyazaki, A., 2007. TNF-alpha drives human CD14+

- monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *J Immunol* 179, 1449–1457. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1449>
- Iyer, S.S., He, Q., Janczy, J.R., Elliott, E.I., Zhong, Z., Olivier, A.K., Sadler, J.J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S.C., Nauseef, W.M., Cassel, S.L., Sutterwala, F.S., 2013. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 39, 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.001>
- Jääskeläinen, A., Nevanperä, N., Remes, J., Rahkonen, F., Järvelin, M.-R., Laitinen, J., 2014. Stress-related eating, obesity and associated behavioural traits in adolescents: a prospective population-based cohort study. *BMC Public Health* 14, 321. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-321>
- Jabbari, E., Woodside, J., Guo, T., Magdalinou, N.K., Chelban, V., Athauda, D., Lees, A.J., Foltynie, T., Houlden, H., Church, A., Hu, M.T., Rowe, J.B., Zetterberg, H., Morris, H.R., 2019. Proximity extension assay testing reveals novel diagnostic biomarkers of atypical parkinsonian syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 90, 768–773. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-320151>
- Jagannathan-Bogdan, M., McDonnell, M.E., Shin, H., Rehman, Q., Hasturk, H., Apovian, C.M., Nikolajczyk, B.S., 2011. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol* 186, 1162–1172. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002615>
- Jain, S.H., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Rosito, G.A., Vasan, R.S., Raji, A., O'Donnell, C.J., Meigs, J.B., Fox, C.S., 2009. Cross-Sectional Associations Between Abdominal and Thoracic Adipose Tissue Compartments and Adiponectin and Resistin in the Framingham Heart Study. *Diabetes Care* 32, 903–908. <https://doi.org/10.2337/dc08-1733>
- Jayashree, B., Bibin, Y.S., Prabhu, D., Shanthirani, C.S., Gokulakrishnan, K., Lakshmi, B.S., Mohan, V., Balasubramanyam, M., 2014. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 388, 203–210. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1911-4>
- Jensen, C.H., Kosmina, R., Rydén, M., Baun, C., Hvidsten, S., Andersen, M.S., Christensen, L.L., Gastaldelli, A., Marraccini, P., Arner, P., Jørgensen, C.D., Laborda, J., Holst, J.J., Andersen, D.C., 2019. The imprinted gene Delta like non-canonical notch ligand 1 (Dlk1) associates with obesity and triggers insulin resistance through inhibition of skeletal muscle glucose uptake. *EBioMedicine* 46, 368–380. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.070>
- Jiang, E., Perrard, X.D., Yang, D., Khan, I.M., Perrard, J.L., Smith, C.W., Ballantyne, C.M., Wu, H., 2014. Essential role of CD11a in CD8+ T-cell accumulation and activation in adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 34–43. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302077>
- Kakudo, N., Morimoto, N., Ogawa, T., Taketani, S., Kusumoto, K., 2015. Hypoxia Enhances Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells via HIF-1 $\alpha$  Activation. *PLoS One* 10, e0139890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139890>
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., Kasuga, M., 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116, 1494–1505. <https://doi.org/10.1172/JCI26498>
- Kang, K.Y., Kim, Y.-K., Yi, H., Kim, J., Jung, H.-R., Kim, I.J., Cho, J.-H., Park, S.-H., Kim, H.-Y., Ju, J.H., 2013. Metformin downregulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *Int Immunopharmacol* 16, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.03.020>

- Kang, Y.J., Jeon, E.S., Song, H.Y., Woo, J.S., Jung, J.S., Kim, Y.K., Kim, J.H., 2005. Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 95, 1135–1145. <https://doi.org/10.1002/jcb.20499>
- Kapsenberg, M.L., 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3, 984–993. <https://doi.org/10.1038/nri1246>
- Karlsson, E.A., Sheridan, P.A., Beck, M.A., 2010. Diet-induced obesity in mice reduces the maintenance of influenza-specific CD8+ memory T cells. *J Nutr* 140, 1691–1697. <https://doi.org/10.3945/jn.110.123653>
- Karlsson, F.H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C.J., Fagerberg, B., Nielsen, J., Bäckhed, F., 2013. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498, 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature12198>
- Kaufman, K.A., Bowen, J.A., Tsai, A.F., Bluestone, J.A., Hunt, J.S., Ober, C., 1999. The CTLA-4 gene is expressed in placental fibroblasts. *Mol Hum Reprod* 5, 84–87. <https://doi.org/10.1093/molehr/5.1.84>
- Keerthivasan, S., Suleiman, R., Lawlor, R., Roderick, J., Bates, T., Minter, L., Anguita, J., Juncadella, I., Nickoloff, B.J., Le Poole, I.C., Miele, L., Osborne, B.A., 2011. Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation. *J Immunol* 187, 692–701. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003658>
- Kelly, S.J., 1977. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool* 200, 365–376. <https://doi.org/10.1002/jez.1402000307>
- Kern, D.E., Gillis, S., Okada, M., Henney, C.S., 1981. The role of interleukin-2 (IL-2) in the differentiation of cytotoxic T cells: the effect of monoclonal anti-IL-2 antibody and absorption with IL-2 dependent T cell lines. *J Immunol* 127, 1323–1328.
- Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., Ranganathan, G., 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E745–751. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.5.E745>
- Kershaw, E.E., Flier, J.S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Key, T.J., Appleby, P.N., Reeves, G.K., Roddam, A., Dorgan, J.F., Longcope, C., Stanczyk, F.Z., Stephenson, H.E., Falk, R.T., Miller, R., Schatzkin, A., Allen, D.S., Fentiman, I.S., Key, T.J., Wang, D.Y., Dowsett, M., Thomas, H.V., Hankinson, S.E., Toniolo, P., Akhmedkhanov, A., Koenig, K., Shore, R.E., Zeleniuch-Jacquotte, A., Berrino, F., Muti, P., Micheli, A., Krogh, V., Sieri, S., Pala, V., Venturelli, E., Secreto, G., Barrett-Connor, E., Laughlin, G.A., Kabuto, M., Akiba, S., Stevens, R.G., Neriishi, K., Land, C.E., Cauley, J.A., Kuller, L.H., Cummings, S.R., Helzlsouer, K.J., Alberg, A.J., Bush, T.L., Comstock, G.W., Gordon, G.B., Miller, S.R., Longcope, C., Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative Group, 2003. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1218–1226. <https://doi.org/10.1093/jnci/djg022>
- Khan, I.M., Dai Perrard, X.-Y., Perrard, J.L., Mansoori, A., Wayne Smith, C., Wu, H., Ballantyne, C.M., 2014. Attenuated adipose tissue and skeletal muscle inflammation in obese mice with combined CD4+ and CD8+ T cell deficiency. *Atherosclerosis* 233, 419–428. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.011>
- Kiefer, F.W., Zeyda, M., Gollinger, K., Pfau, B., Neuhofer, A., Weichhart, T., Säemann, M.D., Geyeregger, R., Schleiderer, M., Kenner, L., Stulnig, T.M., 2010. Neutralization of osteopontin inhibits obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 59, 935–946. <https://doi.org/10.2337/db09-0404>

- Kiefer, F.W., Zeyda, M., Todoric, J., Huber, J., Geyeregger, R., Weichhart, T., Aszmann, O., Ludvik, B., Silberhumer, G.R., Prager, G., Stulnig, T.M., 2008. Osteopontin expression in human and murine obesity: extensive local up-regulation in adipose tissue but minimal systemic alterations. *Endocrinology* 149, 1350–1357. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1312>
- Kilroy, G.E., Foster, S.J., Wu, X., Ruiz, J., Sherwood, S., Heifetz, A., Ludlow, J.W., Stricker, D.M., Potiny, S., Green, P., Halvorsen, Y.-D.C., Cheatham, B., Storms, R.W., Gimble, J.M., 2007. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 212, 702–709. <https://doi.org/10.1002/jcp.21068>
- Kim, D.D., Basu, A., 2016. Estimating the Medical Care Costs of Obesity in the United States: Systematic Review, Meta-Analysis, and Empirical Analysis. *Value Health* 19, 602–613. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2016.02.008>
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T.F.E., Dragun, D., Skurk, T., Hauner, H., Blüher, M., Unger, T., Wolf, A.-M., Knippschild, U., Hombach, V., Marx, N., 2008. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1304–1310. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.165100>
- Kiran, S., Kumar, V., Murphy, E.A., Enos, R.T., Singh, U.P., 2021. High Fat Diet-Induced CD8+ T Cells in Adipose Tissue Mediate Macrophages to Sustain Low-Grade Chronic Inflammation. *Frontiers in Immunology* 12, 2357. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.680944>
- Kitamura, T., Kitamura, Y.I., Funahashi, Y., Shawber, C.J., Castrillon, D.H., Kollipara, R., DePinho, R.A., Kitajewski, J., Accili, D., 2007. A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest* 117, 2477–2485. <https://doi.org/10.1172/JCI32054>
- Kleijn, S. de, Langereis, J.D., Leentjens, J., Kox, M., Netea, M.G., Koenderman, L., Ferwerda, G., Pickkers, P., Hermans, P.W.M., 2013. IFN- $\gamma$ -Stimulated Neutrophils Suppress Lymphocyte Proliferation through Expression of PD-L1. *PLOS ONE* 8, e72249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072249>
- Klover, P.J., Clementi, A.H., Mooney, R.A., 2005. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 146, 3417–3427. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1468>
- Koga, M., Kasayama, S., 2010. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J* 57, 751–762. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k10e-138>
- Kong, W., Yen, J.-H., Ganea, D., 2011. DOCOSAHEXAENOIC ACID PREVENTS DENDRITIC CELL MATURATION, INHIBITS ANTIGEN-SPECIFIC Th1/Th17 DIFFERENTIATION AND SUPPRESSES EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS. *Brain Behav Immun* 25, 872–882. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.09.012>
- Kong, W., Yen, J.-H., Vassiliou, E., Adhikary, S., Toscano, M.G., Ganea, D., 2010. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family. *Lipids Health Dis* 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-12>
- Konrad, D., Wueest, S., 2014. The Gut-Adipose-Liver Axis in the Metabolic Syndrome. *Physiology* 29, 304–313. <https://doi.org/10.1152/physiol.00014.2014>
- Kopan, R., 2012. Notch Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011213. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011213>

- Kopan, R., Ilagan, M.X.G., 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* 137, 216–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>
- Kothari, C., Diorio, C., Durocher, F., 2020. The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 21, 5760. <https://doi.org/10.3390/ijms21165760>
- Kratz, M., Coats, B.R., Hisert, K.B., Hagman, D., Mutskov, V., Peris, E., Schoenfelt, K.Q., Kuzma, J.N., Larson, I., Billing, P.S., Landerholm, R.W., Crouthamel, M., Gozal, D., Hwang, S., Singh, P.K., Becker, L., 2014. Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab* 20, 614–625. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.010>
- Kruglikov, I.L., Scherer, P.E., 2020. The Role of Adipocytes and Adipocyte-Like Cells in the Severity of COVID-19 Infections. *Obesity (Silver Spring)* 28, 1187–1190. <https://doi.org/10.1002/oby.22856>
- Kuehn, H.S., Ouyang, W., Lo, B., Deenick, E.K., Niemela, J.E., Avery, D.T., Schickel, J.-N., Tran, D.Q., Stoddard, J., Zhang, Y., Frucht, D.M., Dumitriu, B., Scheinberg, P., Folio, L.R., Frein, C.A., Price, S., Koh, C., Heller, T., Seroogy, C.M., Huttenlocher, A., Rao, V.K., Su, H.C., Kleiner, D., Notarangelo, L.D., Rampertaap, Y., Olivier, K.N., McElwee, J., Hughes, J., Pittaluga, S., Oliveira, J.B., Meffre, E., Fleisher, T.A., Holland, S.M., Lenardo, M.J., Tangye, S.G., Uzel, G., 2014. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* 345, 1623–1627. <https://doi.org/10.1126/science.1255904>
- Kume, S., Kato, S., Yamagishi, S., Inagaki, Y., Ueda, S., Arima, N., Okawa, T., Kojiro, M., Nagata, K., 2005. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J Bone Miner Res* 20, 1647–1658. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050514>
- Kunz, M., Simon, J.C., Saalbach, A., 2019. Psoriasis: Obesity and Fatty Acids. *Front Immunol* 10, 1807. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01807>
- Lafontan, M., Langin, D., 2009. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48, 275–297. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.05.001>
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233–240. <https://doi.org/10.1084/jem.20041257>
- Larsson, A., Carlsson, L., Lind, A.-L., Gordh, T., Bodolea, C., Kamali-Moghaddam, M., Thulin, M., 2015. The body mass index (BMI) is significantly correlated with levels of cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid. *Cytokine* 76, 514–518. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.010>
- Lazar, M.A., 2007. Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm Metab Res* 39, 710–716. <https://doi.org/10.1055/s-2007-985897>
- Le Magueresse-Battistoni, B., Vidal, H., Naville, D., 2018. Environmental Pollutants and Metabolic Disorders: The Multi-Exposure Scenario of Life. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 582. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00582>
- Lee, J., Pilch, P.F., 1994. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol* 266, C319–334. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.2.C319>
- Lee, J.M., Lee, H., Kang, S., Park, W.J., 2016. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients* 8, 23. <https://doi.org/10.3390/nu8010023>
- Lee, J.Y., Sohn, K.H., Rhee, S.H., Hwang, D., 2001. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276, 16683–16689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011695200>

- Lee, M.J., Kim, J., Kim, M.Y., Bae, Y.-S., Ryu, S.H., Lee, T.G., Kim, J.H., 2010. Proteomic analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Proteome Res* 9, 1754–1762. <https://doi.org/10.1021/pr900898n>
- Lee, M.-J., Wu, Y., Fried, S.K., 2013. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med* 34, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.001>
- Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., Sobel, R.A., Regev, A., Kuchroo, V.K., 2012. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 13, 991–999. <https://doi.org/10.1038/ni.2416>
- Lehr, S., Hartwig, S., Sell, H., 2012. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl* 6, 91–101. <https://doi.org/10.1002/prca.201100052>
- Lei, T., Bi, Y., Gao, M.J., Gao, S.M., Zhou, L.L., Zheng, H.L., Chen, X.D., 2013. HES1 inhibits adipogenesis of porcine mesenchymal stem cells via transcriptional repression of FAD24. *Domest Anim Endocrinol* 45, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.03.003>
- Lerrer, S., Liubomirski, Y., Bott, A., Abnaof, K., Oren, N., Yousaf, A., Körner, C., Meshel, T., Wiemann, S., Ben-Baruch, A., 2017. Co-Inflammatory Roles of TGF $\beta$ 1 in the Presence of TNF $\alpha$  Drive a Pro-inflammatory Fate in Mesenchymal Stem Cells. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00479>
- Leto, D., Saltiel, A.R., 2012. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 383–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3351>
- Levi, Z., Kark, J.D., Twig, G., Katz, L., Leiba, A., Derazne, E., Tzur, D., Liphshitz, I., Keinan-Boker, L., Afek, A., 2018. Body mass index at adolescence and risk of noncardia gastric cancer in a cohort of 1.79 million men and women. *Cancer* 124, 356–363. <https://doi.org/10.1002/cncr.31049>
- Levings, M.K., Bacchetta, R., Schulz, U., Roncarolo, M.G., 2002. The role of IL-10 and TGF- $\beta$  in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129, 263–276. <https://doi.org/10.1159/000067596>
- Li, A.C., Glass, C.K., 2004. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res* 45, 2161–2173. <https://doi.org/10.1194/jlr.R400010-JLR200>
- Li, D., Morris, J.S., Liu, J., Hassan, M.M., Day, R.S., Bondy, M.L., Abbruzzese, J.L., 2009. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA* 301, 2553–2562. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.886>
- Li, J., Doty, A.L., Tang, Y., Berrie, D., Iqbal, A., Tan, S.A., Clare-Salzler, M.J., Wallet, S.M., Glover, S.C., 2017. Enrichment of IL-17A+IFN- $\gamma$ + and IL-22+IFN- $\gamma$ + T cell subsets is associated with reduction of NKp44+ILC3s in the terminal ileum of Crohn's disease patients. *Clinical & Experimental Immunology* 190, 143–153. <https://doi.org/10.1111/cei.12996>
- Li, J., Hsu, H.-C., Mountz, J.D., 2013. The Dynamic Duo—Inflammatory M1 macrophages and Th17 cells in Rheumatic Diseases. *J Orthop Rheumatol* 1, 4. <https://doi.org/10.13188/2334-2846.1000002>
- Li, J., Liu, D., Sun, L., Lu, Y., Zhang, Z., 2012. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective. *J Neurol Sci* 317, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.02.018>

- Li, K., Huang, T., Zheng, J., Wu, K., Li, D., 2014. Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor  $\alpha$ : a meta-analysis. *PLoS One* 9, e88103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088103>
- Li, Y., Zhang, Tengxun, Guo, C., Geng, M., Gai, S., Qi, W., Li, Z., Song, Y., Luo, X., Zhang, Tongcun, Wang, N., 2020. *Bacillus subtilis* RZ001 improves intestinal integrity and alleviates colitis by inhibiting the Notch signalling pathway and activating ATOH-1. *Pathog Dis* 78, ftaa016. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa016>
- Li, Y.-P., Paczesny, S., Lauret, E., Poirault, S., Bordigoni, P., Mekhloufi, F., Hequet, O., Bertrand, Y., Ou-Yang, J.-P., Stoltz, J.-F., Miossec, P., Eljaafari, A., 2008. Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J. Immunol.* 180, 1598–1608. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1598>
- Li, Z., Zhang, C., Du, J.-X., Zhao, J., Shi, M.-T., Jin, M.-W., Liu, H., 2020. Adipocytes promote tumor progression and induce PD-L1 expression via TNF- $\alpha$ /IL-6 signaling. *Cancer Cell Int* 20, 179. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01269-w>
- Liang, M., Liwen, Z., Yun, Z., Yanbo, D., Jianping, C., 2018. The Imbalance between Foxp3+Tregs and Th1/Th17/Th22 Cells in Patients with Newly Diagnosed Autoimmune Hepatitis. *Journal of Immunology Research* 2018, e3753081. <https://doi.org/10.1155/2018/3753081>
- Liang, Y., Luo, H., Zhang, H., Dong, Y., Bao, Y., 2018. Oncogene Delta/Notch-Like EGF-Related Receptor Promotes Cell Proliferation, Invasion, and Migration in Hepatocellular Carcinoma and Predicts a Poor Prognosis. *Cancer Biother Radiopharm* 33, 380–386. <https://doi.org/10.1089/cbr.2018.2460>
- Liu, B., Yu, H., Sun, G., Sun, X., Jin, H., Zhang, C., Shi, W., Tian, D., Liu, K., Xu, H., Li, X., Yin, J., Hong, X., Zhang, D., 2017. OX40 promotes obesity-induced adipose inflammation and insulin resistance. *Cell Mol Life Sci* 74, 3827–3840. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2552-7>
- Liu, H.-Q., Qiu, Y., Mu, Y., Zhang, X.-J., Liu, L., Hou, X.-H., Zhang, L., Xu, X.-N., Ji, A.-L., Cao, R., Yang, R.-H., Wang, F., 2013. A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats. *Nutr Res* 33, 849–858. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.07.004>
- Liu, L., Hu, J., Wang, Y., Lei, H., Xu, D., 2021. The role and research progress of the balance and interaction between regulatory T cells and other immune cells in obesity with insulin resistance. *Adipocyte* 10, 66–79. <https://doi.org/10.1080/21623945.2021.1876375>
- Liu, R., Lauridsen, H.M., Amezcua, R.A., Pierce, R.W., Jane-wit, D., Fang, C., Pellowe, A.S., Kirkiles-Smith, N.C., Gonzalez, A.L., Poher, J.S., 2016. Interleukin-17 Promotes Neutrophil-Mediated Immunity by Activating Microvascular Pericytes and Not Endothelium. *J Immunol* 197, 2400–2408. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600138>
- Liu, S., Song, X., Chrnyk, B.A., Shanker, S., Hoth, L.R., Marr, E.S., Griffor, M.C., 2013. Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nat Commun* 4, 1888. <https://doi.org/10.1038/ncomms2880>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C., 2017. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, Z.-J., Tan, Y., Beecham, G.W., Seo, D.M., Tian, R., Li, Y., Vazquez-Padron, R.I., Pericak-Vance, M., Vance, J.M., Goldschmidt-Clermont, P.J., Livingstone, A.S., Velazquez, O.C., 2012. Notch activation induces endothelial cell senescence and pro-inflammatory response: implication of Notch signaling in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 225, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.04.010>

- Lo, J.C., Ljubicic, S., Leibiger, B., Kern, M., Leibiger, I.B., Moede, T., Kelly, M.E., Chatterjee Bhowmick, D., Murano, I., Cohen, P., Banks, A.S., Khandekar, M.J., Dietrich, A., Flier, J.S., Cinti, S., Blüher, M., Danial, N.N., Berggren, P.-O., Spiegelman, B.M., 2014. Adipsin is an adipokine that improves  $\beta$  cell function in diabetes. *Cell* 158, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.005>
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., Israël, A., 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *PNAS* 95, 8108–8112. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8108>
- Lopez-Santalla, M., Mancheño-Corvo, P., Menta, R., Lopez-Belmonte, J., DelaRosa, O., Bueren, J.A., Dalemans, W., Lombardo, E., Garin, M.I., 2015. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Experimental Autoimmune Arthritis by Modifying Early Adaptive T Cell Responses. *Stem Cells* 33, 3493–3503. <https://doi.org/10.1002/stem.2113>
- Łuczyński, W., Grubczak, K., Moniuszko, M., Głowińska-Olszewska, B., Bossowski, A., 2015. Elevated levels of Th17 cells in children with central obesity. *Scand J Clin Lab Invest* 75, 595–601. <https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1066845>
- Lumeng, C.N., DelProposto, J.B., Westcott, D.J., Saltiel, A.R., 2008. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* 57, 3239–3246. <https://doi.org/10.2337/db08-0872>
- Lyons, T.J., Basu, A., 2012. Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers. *Transl Res* 159, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.01.009>
- Macotela, Y., Emanuelli, B., Mori, M.A., Gesta, S., Schulz, T.J., Tseng, Y.-H., Kahn, C.R., 2012. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* 61, 1691–1699. <https://doi.org/10.2337/db11-1753>
- Maekawa, Y., Minato, Y., Ishifune, C., Kurihara, T., Kitamura, A., Kojima, H., Yagita, H., Sakata-Yanagimoto, M., Saito, T., Taniuchi, I., Chiba, S., Sone, S., Yasutomo, K., 2008. Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* 9, 1140–1147. <https://doi.org/10.1038/ni.1649>
- Maekawa, Y., Tsukumo, S., Chiba, S., Hirai, H., Hayashi, Y., Okada, H., Kishihara, K., Yasutomo, K., 2003. Delta1-Notch3 Interactions Bias the Functional Differentiation of Activated CD4+ T Cells. *Immunity* 19, 549–559. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00270-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00270-X)
- Major, C.D., Wolf, B.A., 2001. Interleukin-1 $\beta$  Stimulation of c-Jun NH2-Terminal Kinase Activity in Insulin-Secreting Cells: Evidence for Cytoplasmic Restriction. *Diabetes* 50, 2721–2728. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.12.2721>
- Makowski, L., Brittingham, K.C., Reynolds, J.M., Suttles, J., Hotamisligil, G.S., 2005. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities. *J Biol Chem* 280, 12888–12895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413788200>
- Malecki, M.J., Sanchez-Irizarry, C., Mitchell, J.L., Histen, G., Xu, M.L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., 2006. Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. *Mol Cell Biol* 26, 4642–4651. <https://doi.org/10.1128/MCB.01655-05>
- Mancarella, S., Serino, G., Dituri, F., Cigliano, A., Ribback, S., Wang, J., Chen, X., Calvisi, D.F., Giannelli, G., 2020. Crenigacestat, a selective NOTCH1 inhibitor, reduces intrahepatic cholangiocarcinoma progression by blocking VEGFA/DLL4/MMP13 axis. *Cell Death Differ* 27, 2330–2343. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0505-4>
- Martí, A., Marcos, A., Martínez, J.A., 2001. Obesity and immune function relationships. *Obes Rev* 2, 131–140. <https://doi.org/10.1046/j.1467-789x.2001.00025.x>

- Martínez-Fernández, L., Laiglesia, L.M., Huerta, A.E., Martínez, J.A., Moreno-Aliaga, M.J., 2015. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 121, 24–41. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.07.003>
- Martin-Orozco, N., Chung, Y., Chang, S.H., Wang, Y.-H., Dong, C., 2009. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 39, 216–224. <https://doi.org/10.1002/eji.200838475>
- Maumus, M., Sengenès, C., Decaunes, P., Zakaroff-Girard, A., Bourlier, V., Lafontan, M., Galitzky, J., Bouloumié, A., 2008. Evidence of in Situ Proliferation of Adult Adipose Tissue-Derived Progenitor Cells: Influence of Fat Mass Microenvironment and Growth. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 4098–4106. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0044>
- Maury, E., Brichard, S.M., 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 314, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.031>
- Mazanet, M.M., Hughes, C.C.W., 2002. B7-H1 Is Expressed by Human Endothelial Cells and Suppresses T Cell Cytokine Synthesis. *The Journal of Immunology* 169, 3581–3588. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3581>
- Mazon, J.N., de Mello, A.H., Ferreira, G.K., Rezin, G.T., 2017. The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life Sci* 182, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.06.002>
- McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., Cua, D.J., 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8, 1390–1397. <https://doi.org/10.1038/ni1539>
- McGeachy, M.J., Cua, D.J., Gaffen, S.L., 2019. The IL-17 family of cytokines in health and disease. *Immunity* 50, 892–906. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>
- McGillcuddy, F.C., Chiquoine, E.H., Hinkle, C.C., Kim, R.J., Shah, R., Roche, H.M., Smyth, E.M., Reilly, M.P., 2009. Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway. *J Biol Chem* 284, 31936–31944. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.061655>
- McLaughlin, T., Liu, L.-F., Lamendola, C., Shen, L., Morton, J., Rivas, H., Winer, D., Tolentino, L., Choi, O., Zhang, H., Hui Yen Chng, M., Engleman, E., 2014. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 2637–2643. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304636>
- Melief, S.M., Geutskens, S.B., Fibbe, W.E., Roelofs, H., 2013a. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica* 98, 888–895. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.078055>
- Melief, S.M., Zwaginga, J.J., Fibbe, W.E., Roelofs, H., 2013b. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med* 2, 455–463. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0184>
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31, 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- Merkel, M., Eckel, R.H., Goldberg, I.J., 2002. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 43, 1997–2006. <https://doi.org/10.1194/jlr.r200015-jlr200>

- Merrick, D., Sakers, A., Irgebay, Z., Okada, C., Calvert, C., Morley, M.P., Percec, I., Seale, P., 2019. Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science* 364, eaav2501. <https://doi.org/10.1126/science.aav2501>
- Meurette, O., Mehlen, P., 2018. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 34, 536–548. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.009>
- Meyer Zu Horste, G., Wu, C., Wang, C., Cong, L., Pawlak, M., Lee, Y., Elyaman, W., Xiao, S., Regev, A., Kuchroo, V.K., 2016. RBPJ Controls Development of Pathogenic Th17 Cells by Regulating IL-23 Receptor Expression. *Cell Rep* 16, 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.088>
- Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J., Bradfield, C.A., 2010. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol.* 185, 3190–3198. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903670>
- Miller, P.E., Van Elswyk, M., Alexander, D.D., 2014. Long-chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Hypertens* 27, 885–896. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu024>
- Minter, L.M., Turley, D.M., Das, P., Shin, H.M., Joshi, I., Lawlor, R.G., Cho, O.H., Palaga, T., Gottipati, S., Telfer, J.C., Kostura, L., Fauq, A.H., Simpson, K., Such, K.A., Miele, L., Golde, T.E., Miller, S.D., Osborne, B.A., 2005. Inhibitors of  $\gamma$ -secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat Immunol* 6, 680–688. <https://doi.org/10.1038/ni1209x>
- Miossec, P., Korn, T., Kuchroo, V.K., 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361, 888–898. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0707449>
- Mitterberger, M.C., Mattesich, M., Zwerschke, W., 2014. Bariatric surgery and diet-induced long-term caloric restriction protect subcutaneous adipose-derived stromal/progenitor cells and prolong their life span in formerly obese humans. *Exp Gerontol* 56, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.030>
- Mohammadi, E., Rafraf, M., Farzadi, L., Asghari-Jafarabadi, M., Sabour, S., 2012. Effects of omega-3 fatty acids supplementation on serum adiponectin levels and some metabolic risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Asia Pac J Clin Nutr* 21, 511–518.
- Mohr, O.L., 1919. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics* 4, 275–282.
- Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Chawla, A., Locksley, R.M., 2013. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med* 210, 535–549. <https://doi.org/10.1084/jem.20121964>
- Monk, J.M., Hou, T.Y., Turk, H.F., Weeks, B., Wu, C., McMurray, D.N., Chapkin, R.S., 2012. Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) Decrease Obesity-Associated Th17 Cell-Mediated Inflammation during Colitis. *PLOS ONE* 7, e49739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049739>
- Monk, J.M., Liddle, D.M., De Boer, A.A., Brown, M.J., Power, K.A., Ma, D.W., Robinson, L.E., 2015. Fish-oil-derived n-3 PUFAs reduce inflammatory and chemotactic adipokine-mediated cross-talk between co-cultured murine splenic CD8+ T cells and adipocytes. *J Nutr* 145, 829–838. <https://doi.org/10.3945/jn.114.205443>
- Moreno-Navarrete, J.M., Catalán, V., Ortega, F., Gómez-Ambrosi, J., Ricart, W., Frühbeck, G., Fernández-Real, J.M., 2010. Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutrition & Metabolism* 7, 27. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-27>

- Mori, A., Sakurai, H., Choo, M.-K., Obi, R., Koizumi, K., Yoshida, C., Shimada, Y., Saiki, I., 2006. Severe pulmonary metastasis in obese and diabetic mice. *Int J Cancer* 119, 2760–2767. <https://doi.org/10.1002/ijc.22248>
- Moseti, D., Regassa, A., Kim, W.-K., 2016. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 124. <https://doi.org/10.3390/ijms17010124>
- Mukherjee, S., Schaller, M.A., Neupane, R., Kunkel, S.L., Lukacs, N.W., 2009. Regulation of T Cell Activation by Notch Ligand, DLL4, Promotes IL-17 Production and Rorc Activation. *The Journal of Immunology* 182, 7381–7388. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804322>
- Munn, D.H., Mellor, A.L., 2013. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* 34, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001>
- Muoio, D.M., Dohm, G.L., Fiedorek, F.T., Tapscott, E.B., Coleman, R.A., Dohn, G.L., 1997. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46, 1360–1363. <https://doi.org/10.2337/diab.46.8.1360>
- Murano, I., Barbatelli, G., Parisani, V., Latini, C., Muzzonigro, G., Castellucci, M., Cinti, S., 2008. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 49, 1562–1568. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800019-JLR200>
- Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Nagareddy, P.R., Kraakman, M., Masters, S.L., Stirzaker, R.A., Gorman, D.J., Grant, R.W., Dragoljevic, D., Hong, E.S., Abdel-Latif, A., Smyth, S.S., Choi, S.H., Korner, J., Bornfeldt, K.E., Fisher, E.A., Dixit, V.D., Tall, A.R., Goldberg, I.J., Murphy, A.J., 2014. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab* 19, 821–835. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.029>
- Najar, M., Krayem, M., Meuleman, N., Bron, D., Lagneaux, L., 2017. Mesenchymal Stromal Cells and Toll-Like Receptor Priming: A Critical Review. *Immune Netw* 17, 89–102. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.2.89>
- Nakajima, C., Mukai, T., Yamaguchi, N., Morimoto, Y., Park, W.-R., Iwasaki, M., Gao, P., Ono, S., Fujiwara, H., Hamaoka, T., 2002. Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN-gamma stimulation. *Eur J Immunol* 32, 1792–1801. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200206\)32:6<1792::AID-IMMU1792>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200206)32:6<1792::AID-IMMU1792>3.0.CO;2-0)
- Nakazawa, A., Dotan, I., Brimnes, J., Allez, M., Shao, L., Tsushima, F., Azuma, M., Mayer, L., 2004. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 126, 1347–1357. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.004>
- Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., 2006. Structural Basis for Cooperativity in Recruitment of MAML Coactivators to Notch Transcription Complexes. *Cell* 124, 973–983. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.037>
- Nettleton, J.A., 1991. Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *J Am Diet Assoc* 91, 331–337.
- Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P.S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., Chawla, A., 2011. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 480, 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature10653>
- Nguyen, M.T.A., Faveyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P.A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C.K., Neels, J.G., Olefsky, J.M., 2007. A subpopulation of macrophages

- infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 282, 35279–35292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706762200>
- Nguyen, T.M.D., 2020. Adiponectin: Role in Physiology and Pathophysiology. *Int J Prev Med* 11. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM\\_193\\_20](https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_193_20)
- Ni, X.-Q., Zhang, Y.-R., Jia, L.-X., Lu, W.-W., Zhu, Q., Ren, J.-L., Chen, Y., Zhang, L.-S., Liu, X., Yu, Y.-R., Jia, M.-Z., Ning, Z.-P., Du, J., Tang, C.-S., Qi, Y.-F., 2021. Inhibition of Notch1-mediated inflammation by intermedin protects against abdominal aortic aneurysm via PI3K/Akt signaling pathway. *Aging (Albany NY)* 13, 5164–5184. <https://doi.org/10.18632/aging.202436>
- Nirschl, C.J., Drake, C.G., 2013. Molecular Pathways: Co-Expression of Immune Checkpoint Molecules: Signaling Pathways and Implications for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 19, 4917–4924. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1972>
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T., 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141–151. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80089-8)
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., Nagai, R., 2009. CD8 + effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine* 15, 914–920. <https://doi.org/10.1038/nm.1964>
- Nomiyama, T., Perez-Tilve, D., Ogawa, D., Gizard, F., Zhao, Y., Heywood, E.B., Jones, K.L., Kawamori, R., Cassis, L.A., Tschöp, M.H., Bruemmer, D., 2007. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 117, 2877–2888. <https://doi.org/10.1172/JCI31986>
- Noronha NC, N. de C., Mizukami, A., Caliári-Oliveira, C., Cominal, J.G., Rocha, J.L.M., Covas, D.T., Swiech, K., Malmegrim, K.C.R., 2019. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther* 10, 131. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y>
- Norris, P.C., Dennis, E.A., 2012. Omega-3 fatty acids cause dramatic changes in TLR4 and purinergic eicosanoid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8517–8522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200189109>
- Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M., Olefsky, J.M., 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142, 687–698. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.041>
- Oldenhove, G., Boucquey, E., Taquin, A., Acolty, V., Bonetti, L., Ryffel, B., Le Bert, M., Englebort, K., Boon, L., Moser, M., 2018. PD-1 Is Involved in the Dysregulation of Type 2 Innate Lymphoid Cells in a Murine Model of Obesity. *Cell Rep* 25, 2053–2060.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.091>
- Oñate, B., Vilahur, G., Camino-López, S., Díez-Caballero, A., Ballesta-López, C., Ybarra, J., Moscattiello, F., Herrero, J., Badimon, L., 2013. Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. *BMC Genomics* 14, 625. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-625>
- O’Neill, L.A.J., Kishton, R.J., Rathmell, J., 2016. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 16, 553–565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>
- Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Walsh, K., 2003. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 14, 561–566. <https://doi.org/10.1097/00041433-200312000-00003>

- Ouyang, W., Kolls, J.K., Zheng, Y., 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454–467. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004>
- Pagano, C., Pilon, C., Olivieri, M., Mason, P., Fabris, R., Serra, R., Milan, G., Rossato, M., Federspil, G., Vettor, R., 2006. Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 3165–3170. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0361>
- Pajvani, U.B., Hawkins, M., Combs, T.P., Rajala, M.W., Doebber, T., Berger, J.P., Wagner, J.A., Wu, M., Knopps, A., Xiang, A.H., Utzschneider, K.M., Kahn, S.E., Olefsky, J.M., Buchanan, T.A., Scherer, P.E., 2004. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279, 12152–12162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311113200>
- Pajvani, U.B., Shawber, C.J., Samuel, V.T., Birkenfeld, A.L., Shulman, G.I., Kitajewski, J., Accili, D., 2011. Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1-dependent manner. *Nat Med* 17, 961–967. <https://doi.org/10.1038/nm.2378>
- Park, H.K., Kwak, M.K., Kim, H.J., Ahima, R.S., 2017. Linking resistin, inflammation, and cardiometabolic diseases. *Korean J Intern Med* 32, 239–247. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.229>
- Park, J.-R., Jung, J.-W., Seo, M.-S., Kang, S.-K., Lee, Y.-S., Kang, K.-S., 2010a. DNER modulates adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via regulation of cell proliferation. *Cell Prolif.* 43, 19–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2009.00650.x>
- Park, J.-R., Jung, J.-W., Seo, M.-S., Kang, S.-K., Lee, Y.-S., Kang, K.-S., 2010b. DNER modulates adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via regulation of cell proliferation. *Cell Prolif.* 43, 19–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2009.00650.x>
- Parks, A.L., Stout, J.R., Shepard, S.B., Klueg, K.M., Dos Santos, A.A., Parody, T.R., Vaskova, M., Muskavitch, M.A.T., 2006. Structure-function analysis of delta trafficking, receptor binding and signaling in *Drosophila*. *Genetics* 174, 1947–1961. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.061630>
- Pastor, F., Dumas, K., Barthélémy, M.-A., Regazzetti, C., Druelle, N., Peraldi, P., Cormont, M., Tanti, J.-F., Giorgetti-Peraldi, S., 2017. Implication of REDD1 in the activation of inflammatory pathways. *Sci Rep* 7, 7023. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07182-z>
- Patsoukis, N., Bardhan, K., Chatterjee, P., Sari, D., Liu, B., Bell, L.N., Karoly, E.D., Freeman, G.J., Petkova, V., Seth, P., Li, L., Boussiotis, V.A., 2015. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* 6, 6692. <https://doi.org/10.1038/ncomms7692>
- Peng, W., Gao, T., Yang, Z.-L., Zhang, S.-C., Ren, M.-L., Wang, Z.-G., Zhang, B., 2012. Adipose-derived stem cells induced dendritic cells undergo tolerance and inhibit Th1 polarization. *Cell Immunol* 278, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.07.008>
- Peng, Y., Chen, X., Liu, Q., Zhang, X., Huang, K., Liu, L., Li, H., Zhou, M., Huang, F., Fan, Z., Sun, J., Liu, Q., Ke, M., Li, X., Zhang, Q., Xiang, A.P., 2015. Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia* 29, 636–646. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.225>
- Pérez, L.M., Bernal, A., Lucas, B. de, Martín, N.S., Mastrangelo, A., García, A., Barbas, C., Gálvez, B.G., 2015. Altered Metabolic and Stemness Capacity of Adipose Tissue-Derived Stem Cells from Obese Mouse and Human. *PLOS ONE* 10, e0123397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123397>

- Pérez, L.M., de Lucas, B., Gálvez, B.G., 2018. Unhealthy Stem Cells: When Health Conditions Upset Stem Cell Properties. *Cell. Physiol. Biochem.* 46, 1999–2016. <https://doi.org/10.1159/000489440>
- Pérez, L.M., de Lucas, B., Lunyak, V.V., Gálvez, B.G., 2017. Adipose stem cells from obese patients show specific differences in the metabolic regulators vitamin D and Gas5. *Mol Genet Metab Rep* 12, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2017.05.008>
- Pérez-Pérez, A., Sánchez-Jiménez, F., Vilariño-García, T., Sánchez-Margalet, V., 2020. Role of Leptin in Inflammation and Vice Versa. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21165887>
- Pintar, A., De Biasio, A., Popovic, M., Ivanova, N., Pongor, S., 2007. The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference? *Biol Direct* 2, 19. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-2-19>
- Pioli, C., Gatta, L., Ubaldi, V., Doria, G., 2000. Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor. *J Immunol* 165, 5530–5536. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.10.5530>
- Pischon, T., Girman, C.J., Hotamisligil, G.S., Rifai, N., Hu, F.B., Rimm, E.B., 2004. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 291, 1730–1737. <https://doi.org/10.1001/jama.291.14.1730>
- Pi-Sunyer, X., 2009. The Medical Risks of Obesity. *Postgrad Med* 121, 21–33. <https://doi.org/10.3810/pgm.2009.11.2074>
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Polyzos, S.A., Kountouras, J., Mantzoros, C.S., 2019. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism, Obesity: the 21st century epidemic* 92, 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.014>
- Pourquié, O., 2000. Segmentation of the paraxial mesoderm and vertebrate somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 47, 81–105. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(08\)60722-x](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(08)60722-x)
- Prestwich, T.C., MacDougald, O.A., 2007. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 19, 612–617. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.09.014>
- Prockop, D.J., 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71–74. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.71>
- Pu, Z., Yang, F., Wang, L., Diao, Y., Chen, D., 2021. Advancements of compounds targeting Wnt and Notch signalling pathways in the treatment of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Journal of Drug Targeting* 29, 507–519. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1864741>
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., Pear, W.S., 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11, 299–308. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80105-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80105-3)
- Qiu, Y., Nguyen, K.D., Odegaard, J.I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R.M., Palmiter, R.D., Chawla, A., 2014. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* 157, 1292–1308. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.066>
- Quintero, P., González-Muniesa, P., García-Díaz, D.F., Martínez, J.A., 2012. Effects of hyperoxia exposure on metabolic markers and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Physiol Biochem* 68, 663–669. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0169-8>

- Raajendiran, A., Ooi, G., Bayliss, J., O'Brien, P.E., Schittenhelm, R.B., Clark, A.K., Taylor, R.A., Rodeheffer, M.S., Burton, P.R., Watt, M.J., 2019. Identification of Metabolically Distinct Adipocyte Progenitor Cells in Human Adipose Tissues. *Cell Rep* 27, 1528–1540.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.010>
- Rajamäki, K., Lappalainen, J., Oörni, K., Välimäki, E., Matikainen, S., Kovanen, P.T., Eklund, K.K., 2010. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 5, e11765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011765>
- Rand, M.D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., Aster, J.C., 2000. Calcium Depletion Dissociates and Activates Heterodimeric Notch Receptors. *Molecular and Cellular Biology* 20, 1825–1835. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.5.1825-1835.2000>
- Rausch, M.E., Weisberg, S., Vardhana, P., Tortoriello, D.V., 2008. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)* 32, 451–463. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803744>
- Rebay, I., Fehon, R.G., Artavanis-Tsakonas, S., 1993. Specific truncations of Drosophila Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* 74, 319–329. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90423-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90423-N)
- Reddy, K.S., 2016. Global Burden of Disease Study 2015 provides GPS for global health 2030. *The Lancet* 388, 1448–1449. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31743-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31743-3)
- Reinert-Hartwall, L., Honkanen, J., Salo, H.M., Nieminen, J.K., Luopajarvi, K., Härkönen, T., Veijola, R., Simell, O., Ilonen, J., Peet, A., Tillmann, V., Knip, M., Vaarala, O., Group, T.D.S., 2015. Th1/Th17 Plasticity Is a Marker of Advanced  $\beta$  Cell Autoimmunity and Impaired Glucose Tolerance in Humans. *The Journal of Immunology* 194, 68–75. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401653>
- Reinhard, C., Shamon, B., Shyamala, V., Williams, L.T., 1997. Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J* 16, 1080–1092. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.1080>
- Restorick, S.M., Durant, L., Kalra, S., Hassan-Smith, G., Rathbone, E., Douglas, M.R., Curnow, S.J., 2017. CCR6+ Th cells in the cerebrospinal fluid of persons with multiple sclerosis are dominated by pathogenic non-classic Th1 cells and GM-CSF-only-secreting Th cells. *Brain, Behavior, and Immunity* 64, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.03.008>
- Rheinheimer, J., de Souza, B.M., Cardoso, N.S., Bauer, A.C., Crispim, D., 2017. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. *Metabolism* 74, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.06.002>
- Richter, L.R., Wan, Q., Wen, D., Zhang, Y., Yu, J., Kang, J.K., Zhu, C., McKinnon, E.L., Gu, Z., Qiang, L., Pajvani, U.B., 2020. Targeted Delivery of Notch Inhibitor Attenuates Obesity-Induced Glucose Intolerance and Liver Fibrosis. *ACS Nano* 14, 6878–6886. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c01007>
- Rider, D.A., Dombrowski, C., Sawyer, A.A., Ng, G.H.B., Leong, D., Hutmacher, D.W., Nurcombe, V., Cool, S.M., 2008. Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26, 1598–1608. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0480>
- Rivera-Cruz, C.M., Huff, K., Figueiredo, M.L., 2018. Abstract LB-289: Polarization of adipose-derived mesenchymal stem cells by toll-like receptors stimulation. *Cancer Res* 78, LB-LB-289. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2018-LB-289>
- Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G., Salmon, P., 1996. An Activated Form of Notch Influences the Choice between CD4 and CD8 T Cell Lineages. *Cell* 87, 483–492. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81368-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81368-9)

- Rocha, V.Z., Folco, E.J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A.H., Libby, P., 2008. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ Res* 103, 467–476. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.177105>
- Rodbell, M., 1964. METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. *J Biol Chem* 239, 375–380.
- Roderick, J.E., Gonzalez-Perez, G., Kuksin, C.A., Dongre, A., Roberts, E.R., Srinivasan, J., Andrzejewski, C., Fauq, A.H., Golde, T.E., Miele, L., Minter, L.M., 2013. Therapeutic targeting of NOTCH signaling ameliorates immune-mediated bone marrow failure of aplastic anemia. *J Exp Med* 210, 1311–1329. <https://doi.org/10.1084/jem.20112615>
- Rohde, K., Keller, M., la Cour Poulsen, L., Blüher, M., Kovacs, P., Böttcher, Y., 2019. Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism* 92, 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.10.007>
- Roldan, M., Macias-Gonzalez, M., Garcia, R., Tinahones, F.J., Martin, M., 2011. Obesity short-circuits stemness gene network in human adipose multipotent stem cells. *FASEB J* 25, 4111–4126. <https://doi.org/10.1096/fj.10-171439>
- Rondeau, P., Navarra, G., Cacciabauda, F., Leone, M., Bourdon, E., Militello, V., 2010. Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 1804, 789–798. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.003>
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., Mortensen, R.M., 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4, 611–617. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80211-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80211-7)
- Rothenberg, E.V., Ungerbäck, J., Champhekar, A., 2016. Chapter Four - Forging T-Lymphocyte Identity: Intersecting Networks of Transcriptional Control, in: Alt, F.W. (Ed.), *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 109–174. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.09.002>
- Rothlein, R., Dustin, M.L., Marlin, S.D., Springer, T.A., 1986. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 137, 1270–1274.
- Rotter, V., Nagaev, I., Smith, U., 2003. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278, 45777–45784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301977200>
- Rovedatti, L., Kudo, T., Biancheri, P., Sarra, M., Knowles, C.H., Rampton, D.S., Corazza, G.R., Monteleone, G., Sabatino, A.D., MacDonald, T.T., 2009. Differential regulation of interleukin 17 and interferon  $\gamma$  production in inflammatory bowel disease. *Gut* 58, 1629–1636. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.182170>
- Roviello, G., Catalano, M., Santi, R., Palmieri, V.E., Vannini, G., Galli, I.C., Buttitta, E., Villari, D., Rossi, V., Nesi, G., 2021. Immune Checkpoint Inhibitors in Urothelial Bladder Cancer: State of the Art and Future Perspectives. *Cancers (Basel)* 13, 4411. <https://doi.org/10.3390/cancers13174411>
- Rutkowski, J.M., Stern, J.H., Scherer, P.E., 2015. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol* 208, 501–512. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409063>
- Saad, M.J.A., Santos, A., Prada, P.O., 2016. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology* 31, 283–293. <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2015>
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J.Y., Ko, H.J., Barrett, T., Kim, J.K., Davis, R.J., 2008. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322, 1539–1543. <https://doi.org/10.1126/science.1160794>

- Saeidi, A., Zandi, K., Cheok, Y.Y., Saeidi, H., Wong, W.F., Lee, C.Y.Q., Cheong, H.C., Yong, Y.K., Larsson, M., Shankar, E.M., 2018. T-Cell Exhaustion in Chronic Infections: Reversing the State of Exhaustion and Reinvigorating Optimal Protective Immune Responses. *Frontiers in Immunology* 9, 2569. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02569>
- Saisho, Y., 2016. Pancreas Volume and Fat Deposition in Diabetes and Normal Physiology: Consideration of the Interplay Between Endocrine and Exocrine Pancreas. *Rev Diabet Stud* 13, 132–147. <https://doi.org/10.1900/RDS.2016.13.132>
- Sassa, T., Kihara, A., 2014. Metabolism of Very Long-Chain Fatty Acids: Genes and Pathophysiology. *Biomol Ther (Seoul)* 22, 83–92. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.017>
- Schaffer, J.E., Lodish, H.F., 1994. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79, 427–436. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90252-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90252-6)
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., Lodish, H.F., 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270, 26746–26749. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26746>
- Schildberg, F.A., Klein, S.R., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2016. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* 44, 955–972. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.002>
- Schlesinger, S., Herder, C., Kannenberg, J.M., Huth, C., Carstensen-Kirberg, M., Rathmann, W., Bönhof, G.J., Koenig, W., Heier, M., Peters, A., Meisinger, C., Roden, M., Thorand, B., Ziegler, D., 2019. General and Abdominal Obesity and Incident Distal Sensorimotor Polyneuropathy: Insights Into Inflammatory Biomarkers as Potential Mediators in the KORA F4/FF4 Cohort. *Diabetes Care* 42, 240–247. <https://doi.org/10.2337/dc18-1842>
- Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T., Zúñiga-Pflücker, J.C., 2004. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med* 200, 469–479. <https://doi.org/10.1084/jem.20040394>
- Schmitt, T.M., Zúñiga-Pflücker, J.C., 2002. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17, 749–756. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00474-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00474-0)
- Schofield, R., 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.
- Schwalie, P.C., Dong, H., Zachara, M., Russeil, J., Alpern, D., Akchiche, N., Caprara, C., Sun, W., Schlaudraff, K.-U., Soldati, G., Wolfrum, C., Deplancke, B., 2018. A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots. *Nature* 559, 103–108. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0226-8>
- Seya, A., Terano, T., Tamura, Y., Yoshida, S., 1988. Comparative effect of leukotriene B4 and leukotriene B5 on calcium mobilization in human neutrophils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 34, 47–50. [https://doi.org/10.1016/0952-3278\(88\)90024-5](https://doi.org/10.1016/0952-3278(88)90024-5)
- Sf, N., S, B., Gl, R., Ie, O., S, H., M, D., Kp, D., Mr, L., R, T., Sm, N., 2015. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer: lessons learned from clinical trials. *Cancer metastasis reviews* 34. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9572-2>
- Shabani, M., Sadeghi, A., Hosseini, H., Teimouri, M., Babaei Khorzoughi, R., Pasalar, P., Meshkani, R., 2020. Resveratrol alleviates obesity-induced skeletal muscle inflammation via decreasing M1 macrophage polarization and increasing the regulatory T cell population. *Sci Rep* 10, 3791. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60185-1>
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2018. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu Rev Food Sci Technol* 9, 345–381. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>

- Shan, T., Liu, J., Wu, W., Xu, Z., Wang, Y., 2017. Roles of Notch Signaling in Adipocyte Progenitor Cells and Mature Adipocytes. *J Cell Physiol* 232, 1258–1261. <https://doi.org/10.1002/jcp.25697>
- Shao, B.-Z., Xu, Z.-Q., Han, B.-Z., Su, D.-F., Liu, C., 2015. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol* 6, 262. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00262>
- Shao, L., Feng, B., Zhang, Y., Zhou, H., Ji, W., Min, W., 2016. The role of adipose-derived inflammatory cytokines in type 1 diabetes. *Adipocyte* 5, 270–274. <https://doi.org/10.1080/21623945.2016.1162358>
- Shao, L., Zhou, H.J., Zhang, H., Qin, L., Hwa, J., Yun, Z., Ji, W., Min, W., 2015. SENP1-mediated NEMO deSUMOylation in adipocytes limits inflammatory responses and type-1 diabetes progression. *Nat Commun* 6, 8917. <https://doi.org/10.1038/ncomms9917>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., Sahebkar, A., 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233, 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Shen, S., Liu, W., Zhou, M., Yang, R., Li, J., Zhou, D., 2021. Combination of structural MRI, functional MRI and brain PET-CT provide more diagnostic and prognostic value in patients of cerebellar ataxia associated with anti-Tr/DNER: a case report. *BMC Neurol* 21, 368. <https://doi.org/10.1186/s12883-021-02403-5>
- Shibata, K., Yamada, H., Sato, T., Dejima, T., Nakamura, M., Ikawa, T., Hara, H., Yamasaki, S., Kageyama, R., Iwakura, Y., Kawamoto, H., Toh, H., Yoshikai, Y., 2011. Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells. *Blood* 118, 586–593. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-334995>
- Shimabukuro, M., Koyama, K., Chen, G., Wang, M.Y., Trieu, F., Lee, Y., Newgard, C.B., Unger, R.H., 1997. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4637–4641. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4637>
- Shimizu, K., Chiba, S., Kumano, K., Hosoya, N., Takahashi, T., Kanda, Y., Hamada, Y., Yazaki, Y., Hirai, H., 1999. Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J Biol Chem* 274, 32961–32969. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32961>
- Shin, H.-Y., Lee, D.C., Chu, S.H., Jeon, J.Y., Lee, M.K., Im, J.A., Lee, J.W., 2012. Chemerin levels are positively correlated with abdominal visceral fat accumulation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 77, 47–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04217.x>
- Shin, J.H., Shin, D.W., Noh, M., 2009. Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes. *Biochemical Pharmacology* 77, 1835–1844. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.03.008>
- Shoda, H., Yanai, R., Yoshimura, T., Nagai, T., Kimura, K., Sobrin, L., Connor, K.M., Sakoda, Y., Tamada, K., Ikeda, T., Sonoda, K.-H., 2015. Dietary Omega-3 Fatty Acids Suppress Experimental Autoimmune Uveitis in Association with Inhibition of Th1 and Th17 Cell Function. *PLoS One* 10, e0138241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138241>
- Shortman, K., Naik, S.H., 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7, 19–30. <https://doi.org/10.1038/nri1996>
- Silva, K.R., Côrtes, I., Liechocki, S., Carneiro, J.R.I., Souza, A.A.P., Borojevic, R., Maya-Monteiro, C.M., Baptista, L.S., 2017. Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots. *PLoS One* 12, e0174115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174115>

- Silva, K.R., Liechocki, S., Carneiro, J.R., Claudio-da-Silva, C., Maya-Monteiro, C.M., Borojevic, R., Baptista, L.S., 2015. Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem Cell Res Ther* 6, 72. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0029-x>
- Simopoulos, A.P., 2011. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol* 44, 203–215. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8162-0>
- Simopoulos, A.P., 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 674–688. <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>
- Sivanathan, K.N., Rojas-Canales, D.M., Hope, C.M., Krishnan, R., Carroll, R.P., Gronthos, S., Grey, S.T., Coates, P.T., 2015. Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function. *Stem Cells* 33, 2850–2863. <https://doi.org/10.1002/stem.2075>
- Snel, M., Jonker, J.T., Schoones, J., Lamb, H., de Roos, A., Pijl, H., Smit, J.W.A., Meinders, A.E., Jazet, I.M., 2012. Ectopic Fat and Insulin Resistance: Pathophysiology and Effect of Diet and Lifestyle Interventions. *International Journal of Endocrinology* 2012, e983814. <https://doi.org/10.1155/2012/983814>
- Soedono, S., Cho, K.W., 2021. Adipose Tissue Dendritic Cells: Critical Regulators of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance. *Int J Mol Sci* 22, 8666. <https://doi.org/10.3390/ijms22168666>
- Spiegel, K., Tasali, E., Penev, P., Van Cauter, E., 2004. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med* 141, 846–850. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-141-11-200412070-00008>
- Stahl, A., Evans, J.G., Pattel, S., Hirsch, D., Lodish, H.F., 2002. Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell* 2, 477–488. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00143-0](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00143-0)
- Starnes, T., Robertson, M.J., Sledge, G., Kelich, S., Nakshatri, H., Broxmeyer, H.E., Hromas, R., 2001. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* 167, 4137–4140. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4137>
- Stefanovic-Racic, M., Yang, X., Turner, M.S., Mantell, B.S., Stolz, D.B., Sumpter, T.L., Sipula, I.J., Dedousis, N., Scott, D.K., Morel, P.A., Thomson, A.W., O'Doherty, R.M., 2012. Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. *Diabetes* 61, 2330–2339. <https://doi.org/10.2337/db11-1523>
- Steinbuck, M.P., Winandy, S., 2018. A Review of Notch Processing With New Insights Into Ligand-Independent Notch Signaling in T-Cells. *Front. Immunol.* 9, 1230. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01230>
- Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., Lazar, M.A., 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307–312. <https://doi.org/10.1038/35053000>
- Stienstra, R., Joosten, L.A.B., Koenen, T., van Tits, B., van Diepen, J.A., van den Berg, S.A.A., Rensen, P.C.N., Voshol, P.J., Fantuzzi, G., Hijmans, A., Kersten, S., Müller, M., van den Berg, W.B., van Rooijen, N., Wabitsch, M., Kullberg, B.-J., van der Meer, J.W.M., Kanneganti, T., Tack, C.J., Netea, M.G., 2010. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* 12, 593–605. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.11.011>

- Stitt, A.W., Jenkins, A.J., Cooper, M.E., 2002. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert Opin Investig Drugs* 11, 1205–1223. <https://doi.org/10.1517/13543784.11.9.1205>
- Studer, M., Briel, M., Leimenstoll, B., Glass, T.R., Bucher, H.C., 2005. Effect of different antilipidemic agents and diets on mortality: a systematic review. *Arch Intern Med* 165, 725–730. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.7.725>
- Sugimoto, K., Maekawa, Y., Kitamura, A., Nishida, J., Koyanagi, A., Yagita, H., Kojima, H., Chiba, S., Shimada, M., Yasutomo, K., 2010. Notch2 Signaling Is Required for Potent Antitumor Immunity In Vivo. *The Journal of Immunology* 184, 4673–4678. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903661>
- Sun, K., Kusminski, C.M., Scherer, P.E., 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121, 2094–2101. <https://doi.org/10.1172/JCI45887>
- Sun, P., Xia, S., Lal, B., Eberhart, C.G., Quinones-Hinojosa, A., Maciacyk, J., Matsui, W., Dimeco, F., Piccirillo, S.M., Vescovi, A.L., Latterra, J., 2009. DNER, an epigenetically modulated gene, regulates glioblastoma-derived neurosphere cell differentiation and tumor propagation. *Stem Cells* 27, 1473–1486. <https://doi.org/10.1002/stem.89>
- Sutterwala, F.S., Haasken, S., Cassel, S.L., 2014. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci* 1319, 82–95. <https://doi.org/10.1111/nyas.12458>
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., Sakaguchi, S., 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192, 303–310. <https://doi.org/10.1084/jem.192.2.303>
- Talaat, R.M., Mohamed, S.F., Bassyouni, I.H., Raouf, A.A., 2015. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine* 72, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.12.027>
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., Honjo, T., 1995. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* 5, 1416–1423. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(95\)00279-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(95)00279-x)
- Tang, H., Pang, S., Wang, M., Xiao, X., Rong, Y., Wang, H., Zang, Y.Q., 2010. TLR4 activation is required for IL-17-induced multiple tissue inflammation and wasting in mice. *J Immunol* 185, 2563–2569. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903664>
- Taşkesen, D., Kirel, B., Us, T., 2012. Serum Visfatin Levels, Adiposity and Glucose Metabolism in Obese Adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 4, 76–81. <https://doi.org/10.4274/Jcrpe.547>
- Tax, F.E., Yeagers, J.J., Thomas, J.H., 1994. Sequence of *C. elegans* lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature* 368, 150–154. <https://doi.org/10.1038/368150a0>
- Tchkonia, T., Tchoukalova, Y.D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R.A., Koo, A., Stevenson, M., Chinnappan, D., Cartwright, A., Jensen, M.D., Kirkland, J.L., 2005. Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E267–277. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00265.2004>
- Thomsen, M., Nordestgaard, B.G., 2014. Myocardial Infarction and Ischemic Heart Disease in Overweight and Obesity With and Without Metabolic Syndrome. *JAMA Internal Medicine* 174, 15–22. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.10522>

- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Ting, H.-K., Chen, C.-L., Meng, E., Cherng, J.-H., Chang, S.-J., Kao, C.-C., Yang, M.-H., Leung, F.-S., Wu, S.-T., 2021. Inflammatory Regulation by TNF- $\alpha$ -Activated Adipose-Derived Stem Cells in the Human Bladder Cancer Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 3987. <https://doi.org/10.3390/ijms22083987>
- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., Sharpe, A.H., 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541–547. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90125-6](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90125-6)
- Tohgo, A., Eiraku, M., Miyazaki, T., Miura, E., Kawaguchi, S.-Y., Nishi, M., Watanabe, M., Hirano, T., Kengaku, M., Takeshima, H., 2006. Impaired cerebellar functions in mutant mice lacking DNER. *Mol Cell Neurosci* 31, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.10.003>
- Tong, Z., Liu, W., Yan, H., Dong, C., 2015. Interleukin-17A deficiency ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Immunology* 146, 339–346. <https://doi.org/10.1111/imm.12512>
- Torchinsky, M.B., Blander, J.M., 2010. T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger. *Cell Mol Life Sci* 67, 1407–1421. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0248-3>
- Tourniaire, F., Romier-Crouzet, B., Lee, J.H., Marcotorchino, J., Gouranton, E., Salles, J., Malezet, C., Astier, J., Darmon, P., Blouin, E., Walrand, S., Ye, J., Landrier, J.-F., 2013. Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF- $\kappa$ B. *PLoS One* 8, e66515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066515>
- Tsiloulis, T., Watt, M.J., 2015. Chapter Eight - Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism, in: Bouchard, C. (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Molecular and Cellular Regulation of Adaptation to Exercise*. Academic Press, pp. 175–201. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.016>
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Ugarte, F., Ryser, M., Thieme, S., Fierro, F.A., Navratil, K., Bornhäuser, M., Brenner, S., 2009. Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells. *Exp Hematol* 37, 867–875.e1. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.03.007>
- Unoki, H., Bujo, H., Yamagishi, S., Takeuchi, M., Imaizumi, T., Saito, Y., 2007. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract* 76, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.09.016>
- Vacca, A., Felli, M.P., Palermo, R., Di Mario, G., Calce, A., Di Giovine, M., Frati, L., Gulino, A., Screpanti, I., 2006. Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kappaB pathways in T-cell development and leukemia. *EMBO J* 25, 1000–1008. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600996>
- Valenti, L., Mendoza, R.M., Rametta, R., Maggioni, M., Kitajewski, C., Shawber, C.J., Pajvani, U.B., 2013. Hepatic notch signaling correlates with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes* 62, 4052–4062. <https://doi.org/10.2337/db13-0769>
- Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., Dixit, V.D., 2011. The NLRP3 inflammasome instigates

- obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 17, 179–188. <https://doi.org/10.1038/nm.2279>
- Vasandan, A.B., Jahnavi, S., Shashank, C., Prasad, P., Kumar, A., Prasanna, S.J., 2016. Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Sci Rep* 6, 38308. <https://doi.org/10.1038/srep38308>
- Veeraraghavalu, K., Subbaiah, V.K., Srivastava, S., Chakrabarti, O., Syal, R., Krishna, S., 2005. Complementation of human papillomavirus type 16 E6 and E7 by Jagged1-specific Notch1-phosphatidylinositol 3-kinase signaling involves pleiotropic oncogenic functions independent of CBF1;Su(H);Lag-1 activation. *J Virol* 79, 7889–7898. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7889-7898.2005>
- Venkatesh, V., Nataraj, R., Thangaraj, G.S., Karthikeyan, M., Gnanasekaran, A., Kagineelli, S.B., Kuppana, G., Kallappa, C.G., Basalingappa, K.M., 2018. Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem Cell Investig* 5, 5. <https://doi.org/10.21037/sci.2018.02.02>
- Vijayaraghavan, J., Osborne, B.A., 2018. Notch and T Cell Function - A Complex Tale. *Adv Exp Med Biol* 1066, 339–354. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-89512-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-89512-3_17)
- Vishvanath, L., Gupta, R.K., 2019. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *J Clin Invest* 129, 4022–4031. <https://doi.org/10.1172/JCI129191>
- Vitseva, O.I., Tanriverdi, K., Tchkonja, T.T., Kirkland, J.L., McDonnell, M.E., Apovian, C.M., Freedman, J., Gokce, N., 2008. Inducible Toll-like Receptor and NF-κB Regulatory Pathway Expression in Human Adipose Tissue. *Obesity (Silver Spring)* 16, 932–937. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.25>
- von Lengerke, T., Krauth, C., 2011. Economic costs of adult obesity: a review of recent European studies with a focus on subgroup-specific costs. *Maturitas* 69, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.04.005>
- Vu, D., Ong, J.M., Clemens, T.L., Kern, P.A., 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D induces lipoprotein lipase expression in 3T3-L1 cells in association with adipocyte differentiation. *Endocrinology* 137, 1540–1544. <https://doi.org/10.1210/endo.137.5.8612483>
- Vujovic, S., Henderson, S.R., Flanagan, A.M., Clements, M.O., 2007. Inhibition of gamma-secretases alters both proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 40, 185–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2007.00426.x>
- Wada, J., 2008. Vaspin: a novel serpin with insulin-sensitizing effects. *Expert Opin Investig Drugs* 17, 327–333. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.3.327>
- Wagner, N.-M., Brandhorst, G., Czepluch, F., Lankeit, M., Eberle, C., Herzberg, S., Faustin, V., Riggert, J., Oellerich, M., Hasenfuss, G., Konstantinides, S., Schäfer, K., 2013. Circulating regulatory T cells are reduced in obesity and may identify subjects at increased metabolic and cardiovascular risk. *Obesity (Silver Spring)* 21, 461–468. <https://doi.org/10.1002/oby.20087>
- Wajchenberg, B.L., 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21, 697–738. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0415>
- Waldner, M., Zhang, W., James, I.B., Allbright, K., Havis, E., Bliley, J.M., Almadori, A., Schweizer, R., Plock, J.A., Washington, K.M., Gorantla, V.S., Solari, M.G., Marra, K.G., Rubin, J.P., 2018. Characteristics and Immunomodulating Functions of Adipose-Derived and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Across Defined Human Leukocyte Antigen Barriers. *Front Immunol* 9, 1642. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01642>
- Walunas, T.L., Bakker, C.Y., Bluestone, J.A., 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 183, 2541–2550. <https://doi.org/10.1084/jem.183.6.2541>

- Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., Bluestone, J.A., 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1, 405–413. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-x](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-x)
- Wan, J.-B., Huang, L.-L., Rong, R., Tan, R., Wang, J., Kang, J.X., 2010. Endogenously decreasing tissue n-6/n-3 fatty acid ratio reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting systemic and vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2487–2494. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.210054>
- Wang, C., Wang, L., Liu, J., Song, J., Sun, Y., Lin, P., Liang, K., Liu, F., He, T., Sun, Z., Hou, X., Chen, L., 2016. Irisin modulates the association of interleukin-17A with the presence of non-proliferative diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Endocrine* 53, 459–464. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0905-x>
- Wang, J., Yoshida, T., Nakaki, F., Hiai, H., Okazaki, T., Honjo, T., 2005. Establishment of NOD-Pdcd1<sup>-/-</sup> mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11823–11828. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505497102>
- Wang, L., Wu, Q., Li, Z., Sun, Si, Yuan, J., Li, J., Zhang, Y., Yu, D., Wang, C., Sun, Shengrong, 2019. Delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor promotes stemness to facilitate breast cancer progression. *Cell Signal* 63, 109389. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109389>
- Wang, L., Wu, Q., Zhu, S., Li, Z., Yuan, J., Yu, D., Xu, Z., Li, J., Sun, S., Wang, C., 2017. Delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor (DNER) orchestrates stemness and cancer progression in prostate cancer. *Am J Transl Res* 9, 5031–5039.
- Wang, M., Chen, F., Wang, J., Zeng, Z., Yang, Q., Shao, S., 2018. Th17 and Treg lymphocytes in obesity and Type 2 diabetic patients. *Clinical Immunology* 197, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.09.005>
- Wang, Q., Wu, H., 2018. T Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. *Front Immunol* 9, 2509. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02509>
- Wang, X.-B., Giscombe, R., Yan, Z., Heiden, T., Xu, D., Lefvert, A.K., 2002. Expression of CTLA-4 by human monocytes. *Scand J Immunol* 55, 53–60. <https://doi.org/10.1046/j.0300-9475.2001.01019.x>
- Wang, Y., Li, X., Xing, X., Xue, H., Qi, R., Ji, H., Ma, L., 2020. Notch-Hes1 Signaling Regulates IL-17A+  $\gamma\delta$  +T Cell Expression and IL-17A Secretion of Mouse Psoriasis-Like Skin Inflammation. *Mediators Inflamm* 2020, 8297134. <https://doi.org/10.1155/2020/8297134>
- Wang, Z., Aguilar, E.G., Luna, J.I., Dunai, C., Khuat, L.T., Le, C.T., Mirsoian, A., Minnar, C.M., Stoffel, K.M., Sturgill, I.R., Grossenbacher, S.K., Withers, S.S., Rebhun, R.B., Hartigan-O'Connor, D.J., Méndez-Lagares, G., Tarantal, A.F., Isseroff, R.R., Griffith, T.S., Schalper, K.A., Merleev, A., Saha, A., Maverakis, E., Kelly, K., Aljumaily, R., Ibrahim, S., Mukherjee, S., Machiorlatti, M., Vesely, S.K., Longo, D.L., Blazar, B.R., Canter, R.J., Murphy, W.J., Monjazeb, A.M., 2019. Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade. *Nat Med* 25, 141–151. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0221-5>
- Wang, Z., Li, Z., Wu, Q., Li, C., Li, J., Zhang, Y., Wang, C., Sun, Si, Sun, Shengrong, 2020. DNER promotes epithelial–mesenchymal transition and prevents chemosensitivity through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in breast cancer. *Cell Death Dis* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02903-1>
- Warthen, D.M., Moore, E.C., Kamath, B.M., Morrisette, J.J.D., Sanchez-Lara, P.A., Sanchez, P., Piccoli, D.A., Krantz, I.D., Spinner, N.B., 2006. Jagged1 (JAG1) mutations in

- Alagille syndrome: increasing the mutation detection rate. *Hum Mutat* 27, 436–443. <https://doi.org/10.1002/humu.20310>
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., Mak, T.W., 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctlα-4. *Science* 270, 985–988. <https://doi.org/10.1126/science.270.5238.985>
- Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., Betancourt, A.M., 2010. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>
- Wautier, J.L., Zoukourian, C., Chappay, O., Wautier, M.P., Guillausseau, P.J., Cao, R., Hori, O., Stern, D., Schmidt, A.M., 1996. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 97, 238–243. <https://doi.org/10.1172/JCI118397>
- Weaver, C.T., Elson, C.O., Fouser, L.A., Kolls, J.K., 2013. The Th17 Pathway and Inflammatory Diseases of the Intestines, Lungs and Skin. *Annu Rev Pathol* 8, 477–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130318>
- Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., 2006. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116, 115–124. <https://doi.org/10.1172/JCI24335>
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796–1808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>
- Weitman, E.S., Aschen, S.Z., Farias-Eisner, G., Albano, N., Cuzzone, D.A., Ghanta, S., Zampell, J.C., Thorek, D., Mehrara, B.J., 2013. Obesity impairs lymphatic fluid transport and dendritic cell migration to lymph nodes. *PLoS One* 8, e70703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070703>
- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M.T.-H., Brickey, W.J., Ting, J.P.-Y., 2011. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 12, 408–415. <https://doi.org/10.1038/ni.2022>
- Wen, J., Liu, Q., Liu, M., Wang, B., Li, M., Wang, M., Shi, X., Liu, H., Wu, J., 2021. Increasing Imbalance of Treg/Th17 Indicates More Severe Glucose Metabolism Dysfunction in Overweight/obese Patients. *Arch Med Res* 52, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.11.012>
- Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., Aster, J.C., 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269–271. <https://doi.org/10.1126/science.1102160>
- Whitehead, J.P., Richards, A.A., Hickman, I.J., Macdonald, G.A., Prins, J.B., 2006. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 8, 264–280. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2005.00510.x>
- Wijetunge, S., Ratnayake, R.M.C.J., Kotakadeniya, H.M.S.R.B., Rosairo, S., Albracht-Schulte, K., Ramalingam, L., Moustaid-Moussa, N., Kalupahana, N.S., 2019. Association between serum and adipose tissue resistin with dysglycemia in South Asian women. *Nutr Diabetes* 9, 5. <https://doi.org/10.1038/s41387-019-0071-3>
- Winer, S., Paltser, G., Chan, Y., Tsui, H., Engleman, E., Winer, D., Dosch, H.-M., 2009. Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol* 39, 2629–2635. <https://doi.org/10.1002/eji.200838893>

- Wintterle, S., Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Chen, L., Meyermann, R., Weller, M., Wiendl, H., 2003. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res* 63, 7462–7467.
- Wobma, H.M., Kanai, M., Ma, S.P., Shih, Y., Li, H.W., Duran-Struuck, R., Winchester, R., Goeta, S., Brown, L.M., Vunjak-Novakovic, G., 2018. Dual IFN- $\gamma$ /hypoxia priming enhances immunosuppression of mesenchymal stromal cells through regulatory proteins and metabolic mechanisms. *J Immunol Regen Med* 1, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.regen.2018.01.001>
- Wolfe, M.S., 2019. Structure and Function of the  $\gamma$ -Secretase Complex. *Biochemistry* 58, 2953–2966. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00401>
- Wolfer, A., Bakker, T., Wilson, A., Nicolas, M., Ioannidis, V., Littman, D.R., Wilson, C.B., Held, W., MacDonald, H.R., Radtke, F., 2001. Inactivation of Notch1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8 T cell development. *Nat Immunol* 2, 235–241. <https://doi.org/10.1038/85294>
- Won, J.C., Park, C.-Y., Lee, W.Y., Lee, E.S., Oh, S.W., Park, S.W., 2009. Association of Plasma Levels of Resistin with Subcutaneous Fat Mass and Markers of Inflammation but not with Metabolic Determinants or Insulin Resistance. *Journal of Korean Medical Science* 24, 695–700. <https://doi.org/10.3346/jkms.2009.24.4.695>
- Wu, B., Chiang, H.-C., Sun, X., Yuan, B., Mitra, P., Hu, Y., Curiel, T.J., Li, R., 2020. Genetic ablation of adipocyte PD-L1 reduces tumor growth but accentuates obesity-associated inflammation. *J Immunother Cancer* 8, e000964. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000964>
- Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., Locksley, R.M., 2011. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332, 243–247. <https://doi.org/10.1126/science.1201475>
- Wu, Haiqin, Ye, L., Lu, X., Xie, S., Yang, Q., Yu, Q., 2018. Lactobacillus acidophilus Alleviated Salmonella-Induced Goblet Cells Loss and Colitis by Notch Pathway. *Mol Nutr Food Res* 62, e1800552. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800552>
- Wu, Xiaobo, Hutson, I., Akk, A.M., Mascharak, S., Pham, C.T.N., Hourcade, D.E., Brown, R., Atkinson, J.P., Harris, C.A., 2018. Contribution of Adipose-Derived Factor D/Adipsin to Complement Alternative Pathway Activation: Lessons from Lipodystrophy. *J Immunol* 200, 2786–2797. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701668>
- Wu, Xinyu, Tian, J., Wang, S., 2018. Insight Into Non-Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 9, 1112. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01112>
- Xu, J., Chi, F., Guo, T., Punj, V., Lee, W.N.P., French, S.W., Tsukamoto, H., 2015. NOTCH reprograms mitochondrial metabolism for proinflammatory macrophage activation. *J Clin Invest* 125, 1579–1590. <https://doi.org/10.1172/JCI76468>
- Yamagishi, S.-I., Matsui, T., 2018. Role of Hyperglycemia-Induced Advanced Glycation End Product (AGE) Accumulation in Atherosclerosis. *Ann Vasc Dis* 11, 253–258. <https://doi.org/10.3400/avd.ra.18-00070>
- Yamamoto, N., Yamamoto, S., Inagaki, F., Kawaichi, M., Fukamizu, A., Kishi, N., Matsuno, K., Nakamura, K., Weinmaster, G., Okano, H., Nakafuku, M., 2001. Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem* 276, 45031–45040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105245200>
- Yamawaki, H., Kuramoto, J., Kameshima, S., Usui, T., Okada, M., Hara, Y., 2011. Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 408, 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.039>

- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., Azuma, M., Yagita, H., 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169, 5538–5545. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5538>
- Yan, Y., Jiang, W., Spinetti, T., Tardivel, A., Castillo, R., Bourquin, C., Guarda, G., Tian, Z., Tschopp, J., Zhou, R., 2013. Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity* 38, 1154–1163. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.015>
- Yañez, R., Oviedo, A., Aldea, M., Bueren, J.A., Lamana, M.L., 2010. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res* 316, 3109–3123. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.08.008>
- Yang, C., Kong, A.P.S., Cai, Z., Chung, A.C.K., 2017. Persistent Organic Pollutants as Risk Factors for Obesity and Diabetes. *Curr Diab Rep* 17, 132. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0966-0>
- Yang, N., Li, T., Cheng, J., Tuo, Q., Shen, J., 2019. Role of apelin/APJ system in hypothalamic-pituitary axis. *Clin Chim Acta* 499, 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.09.011>
- Yang, R.-Z., Lee, M.-J., Hu, H., Pray, J., Wu, H.-B., Hansen, B.C., Shuldiner, A.R., Fried, S.K., McLenithan, J.C., Gong, D.-W., 2006. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290, E1253–E1261. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00572.2004>
- Yao, Z., Painter, S.L., Fanslow, W.C., Ulrich, D., Macduff, B.M., Spriggs, M.K., Armitage, R.J., 1995. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 155, 5483–5486.
- Ye, P., Garvey, P.B., Zhang, P., Nelson, S., Bagby, G., Summer, W.R., Schwarzenberger, P., Shellito, J.E., Kolls, J.K., 2001. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25, 335–340. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.3.4424>
- Yin, X., Wei, H., Wu, S., Wang, Z., Liu, B., Guo, L., Bi, H., Guo, D., 2020. DAPT reverses the Th17/Treg imbalance in experimental autoimmune uveitis in vitro via inhibiting Notch signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 79, 106107. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106107>
- Ying, H., Yang, L., Qiao, G., Li, Z., Zhang, L., Yin, F., Xie, D., Zhang, J., 2010. Cutting edge: CTLA-4--B7 interaction suppresses Th17 cell differentiation. *J Immunol* 185, 1375–1378. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903369>
- Youm, Y.-H., Adijiang, A., Vandanmagsar, B., Burk, D., Ravussin, A., Dixit, V.D., 2011. Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology* 152, 4039–4045. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1326>
- Yuan, N., Zhang, H.-F., Wei, Q., Wang, P., Guo, W.-Y., 2018. Expression of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells, Interleukin 10 and Transforming Growth Factor  $\beta$  in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 126, 96–101. <https://doi.org/10.1055/s-0043-113454>
- Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Olszanecka-Glinianowicz, M., Zurakowski, A., 2000. Serum concentrations of TNF-alpha and soluble TNF-alpha receptors in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 1392–1395. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801398>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., Rybak, Z., 2019. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy* 10, 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>

- Zapata-Gonzalez, F., Rueda, F., Petriz, J., Domingo, P., Villarroya, F., Diaz-Delfin, J., de Madariaga, M.A., Domingo, J.C., 2008. Human dendritic cell activities are modulated by the omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid, mainly through PPAR(gamma):RXR heterodimers: comparison with other polyunsaturated fatty acids. *J Leukoc Biol* 84, 1172–1182. <https://doi.org/10.1189/jlb.1007688>
- Zaragosi, L.-E., Ailhaud, G., Dani, C., 2006. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 24, 2412–2419. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0006>
- Zeng, C., Shi, X., Zhang, B., Liu, H., Zhang, L., Ding, W., Zhao, Y., 2012. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med (Berl)* 90, 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0816-5>
- Zeng, Z., Wang, L., Ma, W., Zheng, R., Zhang, Hong, Zeng, X., Zhang, Hui, Zhang, W., 2019. Inhibiting the Notch signaling pathway suppresses Th17-associated airway hyperresponsiveness in obese asthmatic mice. *Lab Invest* 99, 1784–1794. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0294-x>
- Zhang, P., Yang, Y., Nolo, R., Zweidler-McKay, P.A., Hughes, D.P.M., 2010. Regulation of NOTCH signaling by reciprocal inhibition of HES1 and Deltex 1 and its role in osteosarcoma invasiveness. *Oncogene* 29, 2916–2926. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.62>
- Zhang, S.-Y., Dong, Y.-Q., Wang, P., Zhang, X., Yan, Y., Sun, L., Liu, B., Zhang, D., Zhang, H., Liu, H., Kong, W., Hu, G., Shah, Y.M., Gonzalez, F.J., Wang, X., Jiang, C., 2018. Adipocyte-derived Lysophosphatidylcholine Activates Adipocyte and Adipose Tissue Macrophage Nod-Like Receptor Protein 3 Inflammasomes Mediating Homocysteine-Induced Insulin Resistance. *EBioMedicine* 31, 202–216. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.04.022>
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
- Zheng, C., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Liu, K., Shou, P., Qian, F., Wang, Y., Shi, Y., 2016. Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. *Cell Death Dis* 7, e2167–e2167. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.54>
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>
- Zúñiga, L.A., Shen, W.-J., Joyce-Shaikh, B., Pyatnova, E.A., Richards, A.G., Thom, C., Andrade, S.M., Cua, D.J., Kraemer, F.B., Butcher, E.C., 2010. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol* 185, 6947–6959. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001269>